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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

DE 5695

UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1

1994

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE NANCY INTERUNIVERSITAIRE

THESE

présentée et soutenue publiquement

le 16 décembre 1994

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY 1

Mention Sciences du médicament

par

Nadine HARTMANN

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

DISTRIBUTION CEREBRALE D'AGENTS GABAERGIQUES PAR DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE ET CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES

MEMBRES DU JURY

Président : Pr. B. Krafft

Juges : Dr. D. Decolin
Dr. D. Desor
Dr. J.M. Linget
Dr. A. Minn

Rapporteurs : Pr. J. Caston
Dr. G. Schlewer

104 030135 0

REMERCIEMENTS

Je suis très reconnaissante au Pr. B. Krafft de m'avoir accueillie au sein de son Laboratoire.

Je remercie D. Desor qui, dans son équipe, m'a donné l'opportunité de réaliser un travail très intéressant et de développer des initiatives personnelles.

Je remercie plus particulièrement Marie Trabalon. Sa sympathie, ses conseils judicieux et ses encouragements ont été d'un grand réconfort.

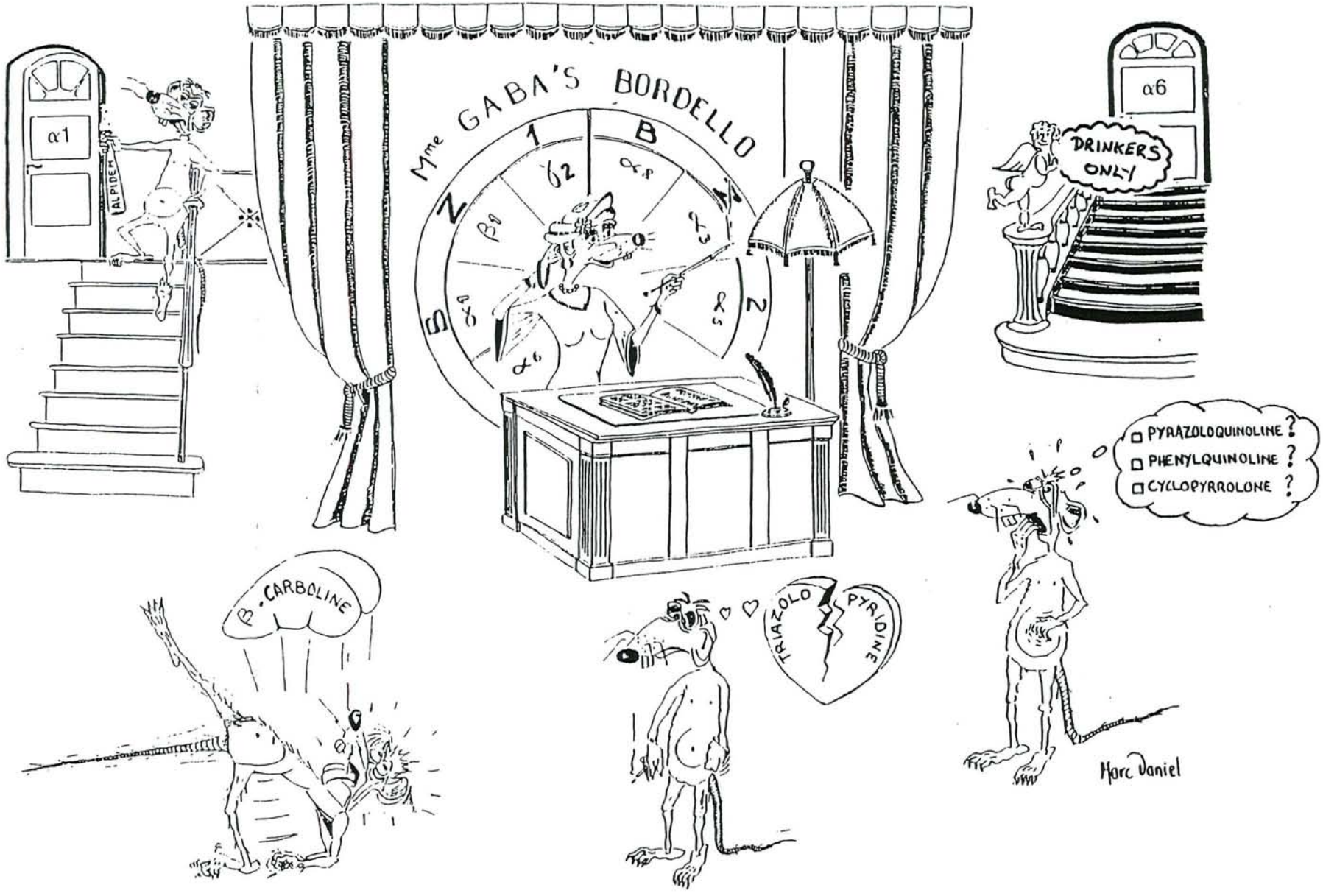
Je tiens également à remercier :

- *le Pr. J. Caston qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être rapporteur,*
- *le Dr. A. Minn pour sa collaboration active et la correction de ce mémoire, ainsi que le Dr. D. Decolin qui a réalisé les analyses biochimiques,*
- *le Dr. G. Schlewer qui a aimablement accepté de juger ce travail et d'en être rapporteur,*
- *le Dr. J.M. Linget qui est à l'origine du sujet de ce travail et a élaboré les systèmes de libération chimique,*
- *l'ensemble des techniciens du Laboratoire pour les aides diverses qu'ils m'ont apportées et pour leur bonne humeur.*

Je tiens particulièrement à remercier ma grand-mère pour son soutien moral et alimentaire ainsi que Claude pour sa patience et son fidèle soutien.

Que mes parents et beaux parents qui m'ont permis de mener ce travail à terme, trouvent ici l'expression de ma reconnaissance.

Enfin, un grand merci à tous mes amis pour leur soutien moral.


Mme GABA'S BORDELLO
α1
ALPIDEM
α6
DRINKERS ONLY
β-CARBOLINE
TRIAZOLO
PYRIDINE
PYRAZOLOQUINOLINE ?
PHENYLQUINOLINE ?
CYCLOPYRROLONE ?
Marc Daniel

BIBLIOTHÈQUE INTERUNIVERSITAIRE PHARMACIE NANCY

TABLE DES MATIERES

Abréviations 1

INTRODUCTION 3

CHAPITRE 1 : LE GABA ET LES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE 6

I. LE GABA 6
A. Métabolisme du GABA 6
B. Les récepteurs GABA 7
1. Récepteurs bloqués par la bicuculline : les récepteurs $GABA_A$ 7
2. Récepteurs insensibles à la bicuculline 9
C. Les substances agissant sur la neurotransmission GABAergique 11
1. Les ligands endogènes des récepteurs GABA 12
2. Les substances agissant sur les récepteurs $GABA_A$ 12
3. Les substances agissant sur les récepteurs $GABA_B$ 14
4. Les inhibiteurs des enzymes du métabolisme du GABA 15
5. Les inhibiteurs de la recapture du GABA 16
D. Implications physiologiques des récepteurs GABA 18
E. Les voies GABAergiques 18
1. Les neurones GABAergiques dans le cortex cérébral 19
2. Les neurones GABAergiques dans l'hippocampe 20
3. Les neurones GABAergiques dans les ganglions basaux (noyaux gris centraux) 20
4. Les neurones GABAergiques dans l'amygdale 21
5. Les neurones GABAergiques dans le cervelet 21
6. Les neurones GABAergiques dans le bulbe rachidien 22
7. Les neurones GABAergiques dans la moëlle épinière 23
8. Le GABA dans les tissus périphériques 23
F. Effets comportementaux du GABA 24
1. Effets anticonvulsivants du GABA 26
2. Rôle du GABA dans d'autres désordres neurologiques et psychiatriques 27
3. Rôles du GABA dans la dépression 28
4. Rôles du GABA dans l'alcoolisme 29
5. Effets du GABA sur l'agressivité 29
6. Effets du GABA sur le comportement reproducteur 30
7. Effets analgésiques du GABA 30
8. Effets du GABA sur l'activité motrice et exploratrice 31
9. Effets du GABA sur l'équilibration 32
10. Effets du GABA sur le tonus musculaire 32
11. Effets du GABA sur la mémoire et l'apprentissage 33
12. Effets anxiolytiques du GABA 33
G. Interactions GABA-BZD 35

II. LES BENZODIAZEPINES (BZD) 36
A. Historique 36
B. Mécanisme d'action des BZD 37
C. Les récepteurs BZD 37
D. Interactions au niveau du complexe récepteur GABA-BZD 38
E. Les ligands du récepteur BZD 39
1. Agonistes du récepteur BZD 39
2. Agonistes inverses du récepteur BZD 40
3. Antagonistes du récepteur BZD 40

4. Agonistes partiels et agonistes inverses partiels du récepteur BZD 40
5. Ligands endogènes du récepteur BZD 42

III. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE 42
A. Barrière morphologique 43
1. Capillaires cérébraux 43
2. Plexus choroïdes 44
3. Villosités arachnoïdiennes 44
4. Ependyme 45
B. Barrière métabolique 45
C. Considérations physiologiques 46
D. Processus de passage à travers la BHE 47
1. Diffusion simple 48
2. Diffusion facilitée et transport actif 49
E. Conséquences pharmacologiques 53
1. Facteurs influençant le passage des médicaments à travers la BHE 53
2. Atteinte de la BHE dans certains états pathologiques ou expérimentaux 54
3. Différentes méthodes développées pour libérer les médicaments dans le SNC 56

IV. LES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE (SLC) 59
A. Historique 59
B. Principe 60
C. Revue bibliographique : substances actives couplées 61
1. SLC appliqués aux neurotransmetteurs et aux acides aminés 61
2. SLC appliqués aux stéroïdes 65
3. SLC appliqués aux agents antiviraux 68
4. SLC appliqués aux antibiotiques 70
5. SLC appliqués aux agents anti-infectieux 71
6. SLC appliqués aux agents anticancéreux 72
7. SLC appliqués aux agents antiépileptiques 72
8. SLC appliqués aux antidépresseurs 74
9. SLC dirigés vers d'autres organes 74
D. Inconvénients de la méthode des SLC 75

V. Objectifs 75

CHAPITRE 2 : EVALUATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE POUR LE GABA ET L'ACIDE NIPECOTIQUE 77

I. Choix de différents transporteurs pour le GABA et l'acide nipécotique 77

II. Caractéristiques chimiques des SLC 78
A. Potentiels d'oxydo-réduction 78
B. Stabilité des SLC en milieu aqueux 79
C. Formation de pseudobases à pH neutre 80
D. Coefficients de partage 80
E. Utilisation des caractéristiques physico-chimiques dans l'analyse des SLC 81

CHAPITRE 3 : ETUDE COMPORTEMENTALE : PRESENTATION DES TESTS ET MATERIEL ET METHODES GENERAL 83

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON 83

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ 85

III. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE 90

IV. TEST DE L'ESCALIER 94

V. TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE 98

CHAPITRE 4 : MISE AU POINT DES TESTS COMPORTEMENTAUX AVEC DIFFERENTS VEHICULES 102

I. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ 103
A. Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v. 60 mn avant le PTZ ; lots non appariés) 103
B. Effet du mélange Transcutol/Tween80 en proportions variables (i.v. 60 mn avant le PTZ ; lots appariés) 104
C. Discussion 105

II. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE 105
A. Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.p. 35 mn avant le test) 105

III. TEST DE L'ESCALIER 106
A. Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v., 30 mn avant le test) 106
B. Effet du mélange Transcutol/Tween80 en différentes proportions (i.v. 60 mn avant le test) 107

IV. DISCUSSION 108

CHAPITRE 5 : PROPRIETES ANXIOLYTIQUES ET ANTICONVULSIVANTES DU DZP 109

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON 109
A. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol à 10% chez le rat Wistar 109
B. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar 110
C. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Long-Evans 111
D. Discussion 112

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ 112
A. Effet du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar 112
B. Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar 114
C. Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Long-Evans 116
D. Discussion 117

III. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE 117

A. Effet d'un premier passage dans le dispositif sans traitement, 100 mn avant le deuxième passage avec traitement par le DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le deuxième passage) 118
B. Effet du DZP (0.25-1 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% 119
C. Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5% 121
D. Discussion 122

IV. TEST DE L'ESCALIER 122
A. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol chez le rat Wistar 122
B. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI chez le rat Wistar 124
C. Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI chez le rat Long-Evans 125
D. Effet du DZP (0.5-1 mg/kg, i.v. 30 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez le rat Wistar 127
E. Effet du DZP (0.1-0.4 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez le rat Wistar 129
F. Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience 130
G. Influence du handling sur les effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience 131
H. Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience 134
I. Effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience 136
J. Discussion 139

CHAPITRE 6 : PROPRIETES ANXIOLYTIQUES ET ANTICONVULSIVANTES DU SK&F-89976-A 141

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON 141
A. Effet du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p.), dissous dans une solution de DMI à 25% (30 mn) 141

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ 142
A. Effet du SK&F-89976-A (4-32 mg/kg, i.p.), dissous dans une solution de DMI à 25% (30 mn) 142

III. TEST DE L'ESCALIER 145
A. Effet du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p.) en solution dans le DMI à 25% (30 mn) 145
B. Effet du SK&F-89976-A (3-24 mg/kg, i.p.) en solution dans le NaCl 9‰ (30 mn) 146
C. Discussion 148

CHAPITRE 7 : PROPRIETES ANXIOLYTIQUES DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE APPLIQUES AU GABA ET A L'ACIDE NIPECOTIQUE 150

I. TEST DE L'ESCALIER 150

A. Effets du SLC13 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation) 150
B. Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation) 153
C. Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation) 155
D. Effets du SLC13 (2.5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 156
E. Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 160
F. Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v.) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 163
G. Effets du SLC17 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 165
H. Effets du SLC18 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 167
I. Effets du SLC19 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 170
1. Matériel et méthodes 170
2. Résultats 171
J. Effets du SLC13 (2.5-10 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 173
K. Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 176
L. Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation) 178
M. Discussion 181

II. TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE 185
A. Effets des SLC13, 14, 15, 17, 18 et 19 (10 ou 20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% 185
B. Discussion 187

CHAPITRE 8 : ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE 189

I. MISE AU POINT DES METHODES DE DETECTION PAR HPLC 189
A. Méthode de détection des SLC sous forme lipophile 189
B. Méthode de détection des SLC sous forme hydrophile 190
C. Méthode de détection des transporteurs seuls 192
D. Méthode de détection du GABA 193

II. ANALYSE DU PLASMA ET DES HOMOGENATS DE CERVEAU APRES ADMINISTRATION I.V. DES SLC 193
A. Matériel et méthodes 193
B. Résultats 194
1. Détection des SLC sous forme lipophile 194

2. Détection des SLC sous forme hydrophile 194
3. Détection des transporteurs seuls 195
C. Discussion 195

CHAPITRE 9 : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION 197

I. CONTRIBUTION DES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX UTILISES 197
A. Test de suppression néophobique de la prise de boisson 197
B. Test d'inhibition des convulsions induites par le PTZ 199
C. Test du labyrinthe en croix surélevé 202
D. Test de l'escalier 206
E. Test de l'enfouissement défensif conditionné 209
F. Conclusion 211

II. ANALYSE DES RESULTATS PAR SUBSTANCE TESTEE 212
A. DZP 212
B. SK&F-89976-A 212
C. SLC 214
1. Résultats comportementaux obtenus avec les SLC 214
2. Analyse par rapport aux caractéristiques chimiques des SLC 219

III. CONCLUSION GENERALE 220

BIBLIOGRAPHIE 222

ABREVIATIONS

ACTH	"Adreno cortico tropin hormone" ou corticotropine
ADP	Adénosine diphosphate
AOAA	Acide amino-oxy-acétique
3-APS	Acide 3-aminopropane sulfonique
ATP	Adénosine triphosphate
ATPase	Adénosine triphosphatase
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BMC	Méthochlorure de bicuculline
BZD	Benzodiazépine
CDP	Chlordiazépoxide
DAVA	Acide δ-aminovalérique
DHM	4,5-Dihydromuscimol
DMI	Diméthylisosorbide éther
DPB	Groupement 4,4-diphényl-3-buténYl
DZP	Diazépam
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GABARINS	"GABA-Receptor-INhibitorS"
GABA-SLC	Système de libération chimique appliqué au GABA
GABA-T	GABA α-cétoglutarate transaminase
GABOB	Acide γ-amino-β-oxybutyrique
GAD	Glutamate décarboxylase
GAG	γ-Acétylènique GABA
GMPc	Guanosine 3',5'-monophosphate cyclique
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
i.c.v.	Injection cérébroventriculaire
i.p.	Injection intrapéritonéale
i.v.	Injection intraveineuse
LCR	Liquide céphalo-rachidien
MES	"Maximal Electroshock Seizures" ou crises maximales induites par électrochoc
3-MP	3-Mercaptopropionate
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
N/G	Rapport entre l'affinité pour la recapture neuronale et gliale
nipécotate-SLC	Système de libération chimique appliqué au nipécotate
2-OH-DAVA	Acide 2-hydroxy-δ-aminovalérique
2-PAM	*N*-Méthylpyridinium-2-carbaldoxime
4-PIOL	5-(4-Pipéridyl)-3-isoxazole
pro-2-PAM	1-Méthyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE NANCY INTERUNIVERSITAIRE

P4S	Acide pipéridine-4-sulfonique
PTZ	Pentylènetétrazole
SK&F	Smith Kline & French
SK&F-89976-A	Acide (N(4,4-diphényl-3 butényl) nipécotique
SK&F-100330-A	(N(4,4-diphényl-3 butényl) guvacine
SLC	Système de libération chimique
SLC13	(N-carbéthoxy-3 propyl) carboxamido-3, carbéthoxy-5 dihydro-1,4, N-méthyl pyridine
SLC14	(N-carbobenzyloxy-3 propyl) carboxamido-3, dihydro-1,4, N-méthyl pyridine
SLC15	(N-carboxy-3, dihydro-1,4, N-méthyl quinoléinoyl) nipécotate d'éthyle
SLC17	3-[N-(3-éthoxy carbonyl propyl)], N-méthyl 1,4-dihydro quinoléinamide
SLC18	5-Carbéthoxy, 3-[N-(3-éthoxy carbonyl 1-pipéridinyl) carboxy] N-méthyl, 1,4- dihydro pyridine
SLC19	5-Carbéthoxy, [N-(3-benzyloxy carbonyl propyl)], N-méthyl 1,4-dihydro nicotinamide
SNC	Système nerveux central
THIP	4,5,6,7-Tétrahydroisoxazolo [5,4-*c*] pyridin-3-ol
THPO	4,5,6,7-Tétrahydroisoxazolo [4,5-*c*] pyridin-3-ol

INTRODUCTION

Le traitement des pathologies d'origine cérébrale nécessite une administration centrale de substance active et donc, le franchissement de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Malheureusement, les substances actives en sont très souvent incapables. C'est le cas, par exemple, de la plupart des neurotransmetteurs, qui ont un caractère hydrophile, et notamment, de l'acide γ-aminobutyrique (GABA). Or, de nombreuses situations pathologiques sont dues à un déséquilibre dans les taux de neurotransmetteurs centraux, comme la maladie de Parkinson par exemple, qui est liée à un déficit en dopamine. En dehors des neurotransmetteurs, de nombreuses catégories de médicaments présentent cette incapacité à pénétrer dans le système nerveux central (SNC) : le traitement des tumeurs cérébrales, en particulier, est très difficile à réaliser. Il est donc indispensable de développer des moyens permettant de concentrer les substances actives dans le cerveau. C'est pourquoi, nous avons consacré nos recherches au développement d'un système de distribution spécifiquement cérébrale de médicaments que nous avons appliqué aux substances GABAergiques. Nous avons porté notre choix sur le GABA car un grand nombre de pathologies allant de l'anxiété à l'épilepsie, en passant par la schizophrénie et la maladie de Parkinson, impliquent des déficits du système GABAergique.

La présence de GABA dans le cerveau a été observée pour la première fois par Roberts en 1949 sur des chromatogrammes d'extraits de neuroblastomes (Roberts, 1984). Le GABA est un neurotransmetteur inhibiteur très largement répandu dans le SNC. On estime qu'il intervient dans 20 à 40% des synapses (Matsumoto, 1989). Il joue un rôle important dans divers cas cliniques. Notamment, des déficits sévères en GABA ont été observés au niveau des ganglions basaux dans les maladies de Parkinson et de Huntington. Dans la schizophrénie, il y a probablement un déséquilibre entre la dopamine et le GABA. Ce neurotransmetteur intervient également dans l'épilepsie et l'anxiété. En effet, de nombreuses expériences neurophysiologiques et biochimiques montrent que les effets de certaines substances anxiolytiques et anticonvulsivantes, en particulier les benzodiazépines (BZD), mettent en jeu les voies GABAergiques (Haefely *et al.*, 1981), la transmission GABAergique étant potentialisée par les BZD (Haefely & Polc, 1983). Par conséquent, une meilleure compréhension des mécanismes sous-tendant les systèmes GABAergiques pourrait permettre de développer les applications cliniques du GABA et de contribuer à l'amélioration du traitement d'un nombre important de situations cliniques. Les premières tentatives de tests cliniques ont échoué du fait des doses extrêmement élevées nécessaires au passage du GABA à travers la BHE qui sépare le SNC du reste de l'organisme (Roberts & Kuriyama, 1968 ; Chase & Walters, 1976). Il semble donc indispensable de mettre au point une méthode de ciblage vers le cerveau qui permette d'évaluer les effets comportementaux du GABA et de définir son application en clinique. Une telle méthode est nécessaire également pour permettre une meilleure administration de

substances dont le site d'action se trouve dans le SNC, notamment les médicaments anticancéreux dans le cas de tumeurs cérébrales.

Bodor *et al.* (1981) ont proposé une méthode de distribution spécifiquement cérébrale dont le principe est de combiner une substance neuroactive à un transporteur de type dihydropyridine. L'ensemble constitue un "système de libération chimique" (SLC), administré sous sa forme lipophile, ce qui permet une répartition dans tout l'organisme, y compris le SNC. *In vivo*, la dihydropyridine est oxydée en sel de pyridinium et devient ainsi hydrophile. En raison de sa taille et de sa charge, cette forme hydrophile du SLC est retenue au niveau central, alors qu'à la périphérie, elle est rapidement éliminée. L'hydrolyse de la liaison transporteur-substance active libère progressivement la substance au niveau du SNC. Ainsi, cette technique permet d'obtenir d'une part, une libération soutenue et spécifiquement centrale de la substance, et d'autre part, une élimination rapide à la périphérie, ce qui réduit considérablement les risques de toxicité systémique. Cette méthode a déjà été appliquée à différentes classes de substances (revue dans Bodor & Brewster, 1991) et nous développerons son principe dans le premier chapitre. De nombreuses mesures physico-chimiques ont été réalisées (dosages centraux et périphériques) et tendraient à montrer l'efficacité de cette méthode, mais très peu de vérifications fonctionnelles, c'est-à-dire comportementales, ont été effectuées. Anderson *et al.* (1987b), par exemple, ont évalué l'activité anxiolytique d'un SLC transportant du GABA (SLC14) dans une procédure de conflit choc électrique/boisson chez le rat. Lorsque la forme lipophile du SLC14 est administrée par voie systémique, les auteurs observent un effet anxiolytique se maintenant pendant 8 h, mais n'étant pas dose-dépendant. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisqu'ils confirment l'efficacité de cette méthode de distribution cérébrale. Toutefois, la grande majorité des travaux publiés sur les SLC concerne des composés particulièrement instables à l'air et le transporteur utilisé est pratiquement toujours le même : la dihydrotrigonelline.

C'est pourquoi, afin de définir des transporteurs actifs mais moins sensibles à l'oxygène de l'air et aux milieux aqueux et afin d'optimiser la liaison substance active-transporteur, Linget (1992) a imaginé de nouveaux transporteurs, plus stables que le SLC14 et les a appliqués au transport du GABA. Pour faciliter le dosage de la quantité de substance active libérée dans le SNC, et en raison de la présence du pool endogène de GABA, ces SLC ont également été appliqués à une substance GABAergique ne traversant pas la BHE, l'acide nipécotique. Il s'agit d'un inhibiteur puissant de la recapture du GABA. Il reproduit de ce fait, une augmentation du taux de GABA dans la fente synaptique.

Afin d'évaluer l'efficacité *in vivo* de ces nouveaux SLC combinés soit au GABA, soit à l'acide nipécotique, nous avons sélectionné une série de tests comportementaux. La première partie de notre travail a donc consisté en la reproduction de ces tests avec des substances connues pour avoir les mêmes effets que le GABA et traversant facilement la BHE. Nous avons choisi d'utiliser le diazépam (DZP), lequel se fixe sur le complexe récepteur GABA/BZD et produit des effets anxiolytique, sédatif, myorelaxant et une activité anticonvulsivante. Puis, nous avons reproduit la même série de tests avec une substance GABAergique, le SK&F-89976-A (acide (*N*(4,4-diphényl-3-butényl) nipécotique). Il s'agit d'acide nipécotique modifié chimiquement de telle manière qu'il soit capable de traverser la BHE. Nous avons choisi cinq tests : quatre tests destinés à évaluer les propriétés anxiolytiques et sédatives d'une substance (test de suppression néophobique de la prise de boisson, test du labyrinthe en croix surélevé, test de l'escalier et test d'enfouissement défensif conditionné) et un test de mesure de l'inhibition des convulsions induites chimiquement permettant de mettre en évidence une activité anticonvulsivante. Parmi ces cinq tests, deux tests ont été sélectionnés pour l'étude des SLC. La deuxième partie de notre travail a consisté en la reproduction de ces deux tests, avec les SLC : le test de l'escalier et le test d'enfouissement défensif conditionné.

Certains SLC ont ensuite été abordés sur le plan biochimique afin d'établir leurs cinétiques de distribution centrale et périphérique. Après administration systémique, nous avons tenté de détecter, par HPLC, à la fois le transporteur seul, la substance active seule et le SLC, dans le sang et dans le cerveau. Ce travail fera l'objet du dernier chapitre. Ces données biochimiques ont ensuite été confrontées à celles obtenues sur le plan comportemental.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie et Physiologie du Comportement de Nancy 1 en collaboration avec deux autres laboratoires : le Dr. J.-M. Linget du Laboratoire de Pharmacochimie moléculaire de Strasbourg (Pr. C. Wermuth) a élaboré et évalué les différents GABA-SLC sur le plan chimique ; nous avons réalisé les tests comportementaux permettant d'évaluer l'efficacité fonctionnelle de ces SLC par une mesure indirecte de la distribution centrale du GABA, au Laboratoire de Biologie et Physiologie du Comportement de Nancy 1 (Pr. B. Krafft) ; les mesures de cinétique de distribution destinées à confirmer les résultats observés sur le plan comportemental ont été effectuées par le Dr. D. Decolin au Centre du Médicament (Pr. G. Siest), en collaboration avec le Dr. A. Minn.

CHAPITRE 1

LE GABA ET LES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE

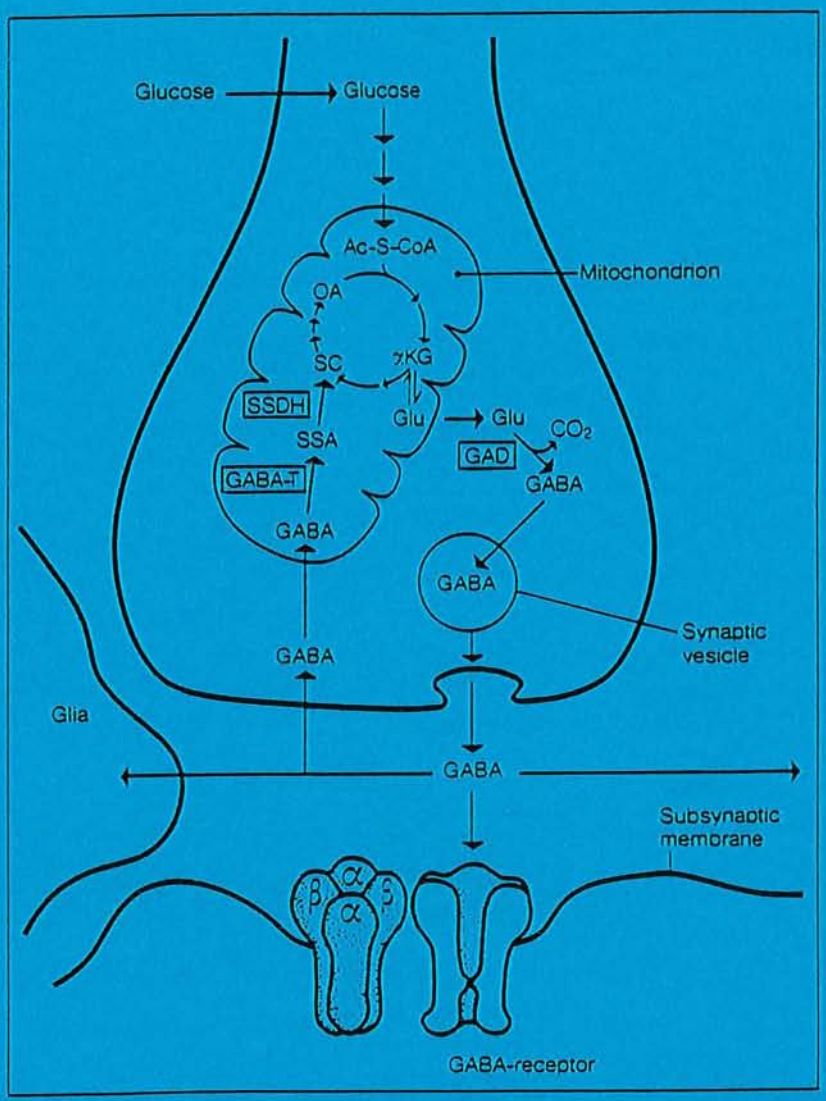


Figure 1: Diagramme schématique d'une synapse GABAergique avec une terminaison GABAergique contenant une mitochondrie et une vésicule synaptique, le neurone post-synaptique sensible au GABA, la fente synaptique et une cellule gliale. Le glutamate synthétisé dans le cycle de Krebs est décarboxylé par la GAD en GABA. Après recapture dans la fente synaptique, le GABA peut réintégrer le cycle après transamination par la GABA-T. SSA: semialdéhyde succinique; SSDH: semialdéhyde succinique déshydrogénase; SC: acide succinique; Glu: glutamate; αKG: α-cétoglutarate (dans Haefely, 1987).

Afin de faire un bilan des recherches effectuées jusqu'à présent dans le cadre des systèmes GABAergiques et des SLC, et afin de replacer notre travail dans un contexte plus large, nous avons consacré ce chapitre à une revue détaillée des connaissances dont nous disposons, tout d'abord en ce qui concerne le GABA, du point de vue biochimique, pharmacologique et comportemental, puis en ce qui concerne les BZD. En effet, il n'est pas pensable d'aborder l'un sans l'autre, étant donné que le GABA et les BZD possèdent, entre autres un site d'action commun, le complexe récepteur GABA/BZD. Nous nous sommes ensuite intéressés à la BHE, puisque l'un des objectifs de ce travail est de permettre au GABA de franchir cette barrière. Nous nous sommes proposés d'étudier le principe des SLC qui, nous le verrons dans la dernière partie de ce chapitre, a été appliqué à la distribution de nombreuses catégories de substances.

I. LE GABA

Le GABA est un acide aminé neurotransmetteur inhibiteur très important dans toutes les régions du SNC. Dans le cortex cérébral, l'hippocampe et la *substantia nigra*, 10 à 40% des terminaisons nerveuses seraient GABAergiques (dans Fonnum, 1987). Au cours des dernières années, de faibles quantités de GABA ont également été trouvées dans différents tissus périphériques (dans Fonnum, 1987). L'utilisation d'agents GABAergiques a dévoilé plusieurs fonctions physiologiques insoupçonnées du GABA, comme des effets sédatifs et anticonvulsivants importants. De plus, il a une action antinociceptive et des effets hypothermiques, il réduit la prise alimentaire et agit sur le système cardio-vasculaire. D'autre part, les propriétés anxiolytiques des BZD sont attribuées à leur implication dans la modulation du récepteur GABA. En clinique, des effets prometteurs ont été observés dans le traitement de l'épilepsie, de la spasmophilie et de la dépression. Le dévelopement de substances GABAergiques a donc de nombreuses applications.

A. Métabolisme du GABA

La voie principale de synthèse correspond à la décarboxylation du glutamate en GABA, catalysée par une glutamate décarboxylase (GAD ; E.C. 4.1.1.15). L'acide α-cétoglutarique, étape du cycle de Krebs, fixe une molécule de NH_3 et fournit le glutamate (Figure 1) qui, grâce à la GAD dont le cofacteur est le pyridoxal-phosphate, est transformé en GABA. Cette synthèse a lieu dans les neurones GABAergiques.

Le catabolisme du GABA est une transamination : le GABA réagit avec l'acide α-cétoglutarique, grâce à une GABA α-cétoglutarate transaminase (GABA-T ; E.C. 2.6.1.19), et est transformé en semialdéhyde succinique qui réintègre le cycle de

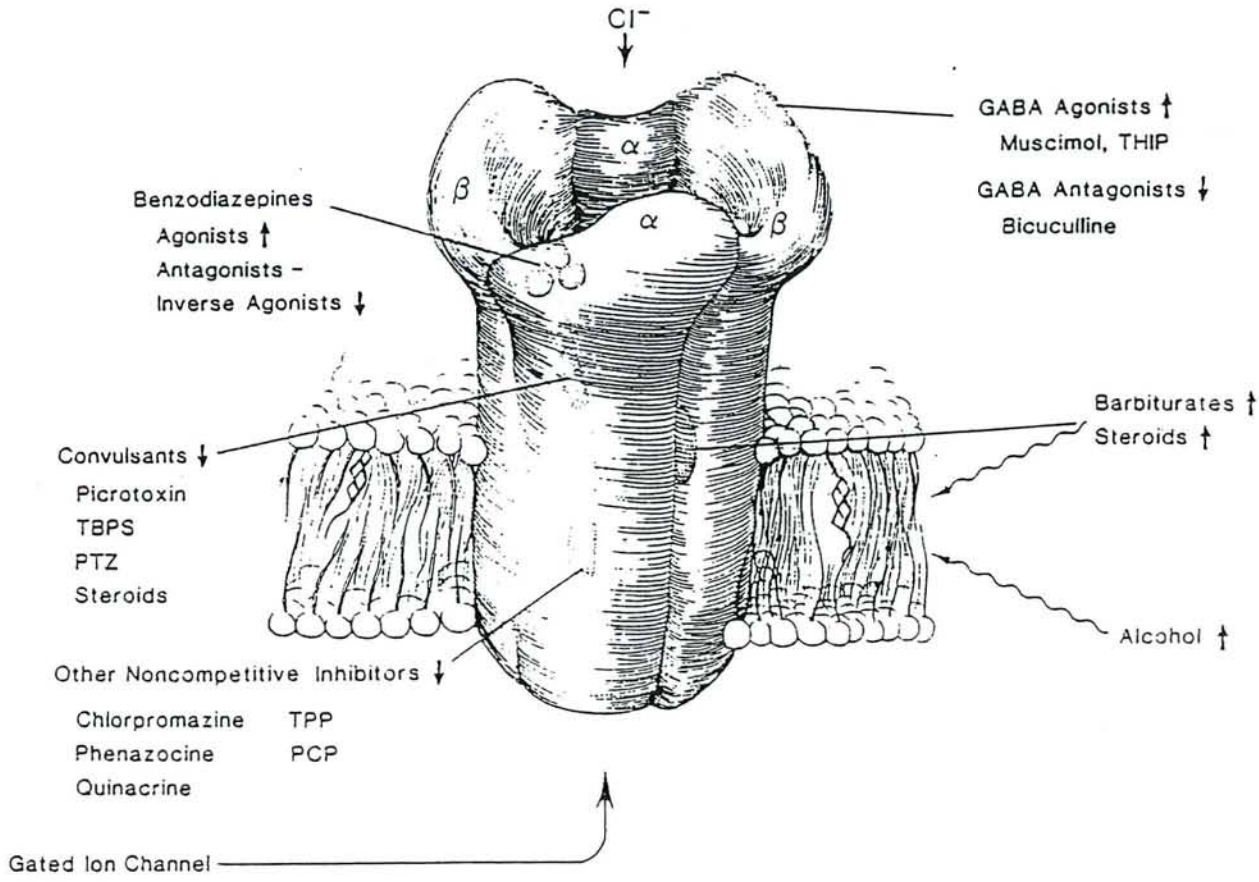


Figure 2: Modèle schématique du complexe récepteur $GABA_A$. Les flèches indiquent une augmentation (↑) ou une inhibition (↓) de l'activité GABAergique par diverses substances. TBPS: *t*-butylbicyclophosphorothionate; TPP: tétraphénylphosphonium; PCP: phencyclidine (dans Schwartz, 1988).

	récepteurs $GABA_A$	**récepteurs $GABA_B$**
agoniste commun	GABA	GABA
agoniste sélectif	muscimol	baclofène
antagoniste sélectif	bicuculline	phaclofène
effecteur	canal Cl^- ↑	canal Ca^{++} ↓ adénylate cyclase canal K^+ ↑
modulateur allostérique	BZD barbituriques certains convulsivants	?

Tableau 1: Principales caractéristiques différenciant les récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$.

Krebs par transformation en acide succinique par la déshydrogénase du semialdéhyde succinique (Figure 1). Cette réaction a lieu dans les terminaisons post-synaptiques aussi bien que dans les cellules gliales environnantes.

A la fin de l'action synaptique, le GABA se sépare du récepteur et est reprélevé par des systèmes de recapture spécifiques qui contribuent à l'arrêt du processus de neurotransmission GABAergique. Les neurones, tout comme les cellules gliales, participent à la recapture du GABA. Des données récentes suggèrent l'existence de trois systèmes de transport du GABA dans les terminaisons nerveuses (Wood & Sidhu, 1986 ; Larsson *et al.*, 1983). Il semblerait que le premier événement dans l'arrêt de l'action synaptique du GABA soit la diffusion facilitée du GABA à travers la membrane post-synaptique, plutôt qu'une entrée dans les terminaisons nerveuses et les cellules gliales par l'intermédiaire d'un transporteur. Le GABA serait ensuite transféré de la cellule post-synaptique aux terminaisons nerveuses et/ou aux cellules gliales. La quantité de GABA accumulée dans les terminaisons, mais pas celle prélevée par les cellules gliales, sera partiellement réutilisée comme neurotransmetteur (Chase & Walters, 1976).

B. Les récepteurs GABA

Alors que l'action "classique" du GABA qui implique l'ouverture de canaux chlorures est bien connue, on a détecté plus récemment des effets pharmacologiquement distincts du GABA sur des canaux cationiques. C'est pourquoi, la notion de sous-types de récepteurs est apparue. Les récepteurs GABA sont actuellement divisés en deux grandes classes hétérogènes qui diffèrent par leur affinité pour les agonistes et antagonistes GABA ainsi que par leur couplage à des transducteurs ou à des effecteurs du signal :

- les récepteurs $GABA_A$ (Figure 2), bloqués par la bicuculline ou par le méthochlorure de bicuculline (BMC)
- et les récepteurs GABA insensibles à la bicuculline, incluant :
  * les récepteurs $GABA_B$ (Tableau 1 ; Hill & Bowery, 1981),
  * les récepteurs $GABA_C$ insensibles à la bicuculline (antagoniste $GABA_A$) et au baclofène (agoniste $GABA_B$) (Johnston, 1986 ; Paredes & Ågmo, 1992)
  * et enfin, les récepteurs $GABA_X$ (Agmo & Giordano, 1985 ; Paredes & Ågmo, 1992).

1. Récepteurs bloqués par la bicuculline : les récepteurs $GABA_A$

Le récepteur $GABA_A$ fait partie d'un complexe macromoléculaire couplé à un canal chlorure. D'un point de vue structural, le complexe récepteur est une glycoprotéine intégrante de la membrane, composée de deux sous-unités distinctes α et β, de poids moléculaires similaires (53 et 57 KDa respectivement). La composition du

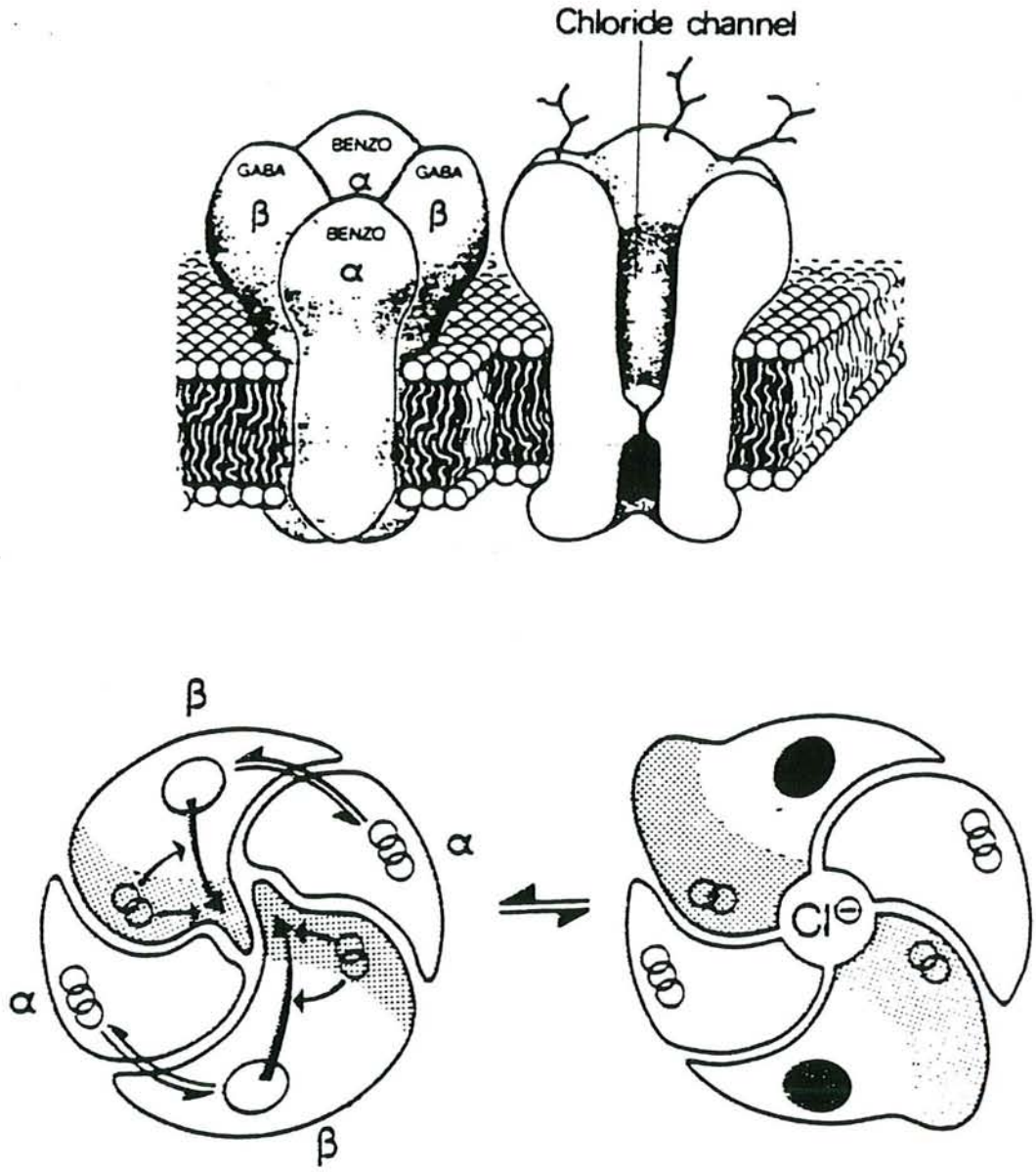


Figure 3: Modèle hypothétique du complexe récepteur $GABA_A$ et de ses sites modulateurs allostériques. En haut, une vue du complexe dans la membrane neuronale, et en bas, une vue du complexe à partir de l'espace extracellulaire. La sous-unité β porte le site GABA (ovale) et les sites allostériques pour les barbituriques et les convulsivants (les deux cercles chevauchés). La sous-unité α porte le site de liaison pour les trois types de ligands du récepteur BZD (les trois cercles chevauchés). Les deux flèches larges représentent le principal fonctionnement du complexe, c'est-à-dire l'ouverture du canal par le changement conformationnel induit par le GABA. Les petites flèches indiquent la modulation allostérique du processus d'ouverture (dans Haefely, 1987).

complexe semble être $\alpha_2\beta_2$ (Mamalaki *et al.*, 1987). Il existe plusieurs types de sous-unités α et β d'une espèce à l'autre et même, au sein d'une seule espèce (Haefely, 1988 ; Sieghart, 1989), ce qui suggère l'existence d'une hétérogénéité structurale de ces complexes récepteurs. Le complexe supramoléculaire forme le site récepteur $GABA_A$ et le canal chlorure, ainsi que les sites modulateurs allostériques associés (Figure 3).

Les récepteurs $GABA_A$ peuvent se trouver dans la membrane post-synaptique (dans les synapses axo-somatiques ou axo-dendritiques) ou dans la membrane pré-synaptique (dans les synapses axo-axoniques). La liaison du GABA au récepteur $GABA_A$ provoque l'ouverture d'un canal chlorure qui est une partie intégrante du récepteur et qui est fermé en l'absence de GABA. Ceci entraîne un flux entrant ou sortant d'ions Cl^-, en fonction du gradient de concentration :

- Le récepteur $GABA_A$ post-synaptique, qui est en fait un complexe récepteur contenant des récepteurs sub-synaptiques, régule le passage des ions Cl^- de telle manière que l'activation du récepteur provoque une hyperpolarisation de la membrane cellulaire et augmente ainsi le seuil d'excitabilité du neurone. Il y a donc un flux net entrant d'ions Cl^-. Ces événements sont responsables de l'effet inhibiteur du GABA sur l'activité neuronale.
- L'activation des récepteurs $GABA_A$ pré-synaptiques provoque normalement un efflux net d'ions Cl^-, ce qui entraîne une dépolarisation partielle de la membrane qui conduit à une diminution de l'amplitude et un ralentissement de la conduction des potentiels d'action et donc à une diminution de la quantité de neurotransmetteur libérée. Il semblerait que cette réponse dépolarisante au GABA soit responsable de l'inhibition pré-synaptique sur les terminaisons afférentes Ia dans la moëlle épinière (dans Bowery, 1983).

Le <u>complexe récepteur $GABA_A$ post-synaptique</u> contiendrait en réalité deux, peut-être même trois sites de liaison ayant des niveaux d'affinité différents pour le GABA (Figure 4) mais on ne connaît pas encore le rôle physiologique de ces sites. Ils sont associés à et modulés par plusieurs unités additionnelles : un site de liaison des BZD (Fonnum, 1987), un site de liaison de la picrotoxine représentant le récepteur pharmacologique des barbituriques (Figure 4 ; Fonnum, 1987) et un site de liaison des stéroïdes (Gee *et al.*, 1987). Le rôle physiologique de ces sites additionnels ("récepteurs pharmacologiques") dans le complexe récepteur GABA, ainsi que les mécanismes d'interaction entre les différents sites récepteurs, n'ont pas encore été entièrement élucidés.

Des <u>récepteurs $GABA_A$ pré-synaptiques</u> (Figure 5) ont été mis en évidence au niveau de la moëlle épinière dans les fibres afférentes Ia (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a) et dans le cerveau à la fois sur des terminaisons nerveuses

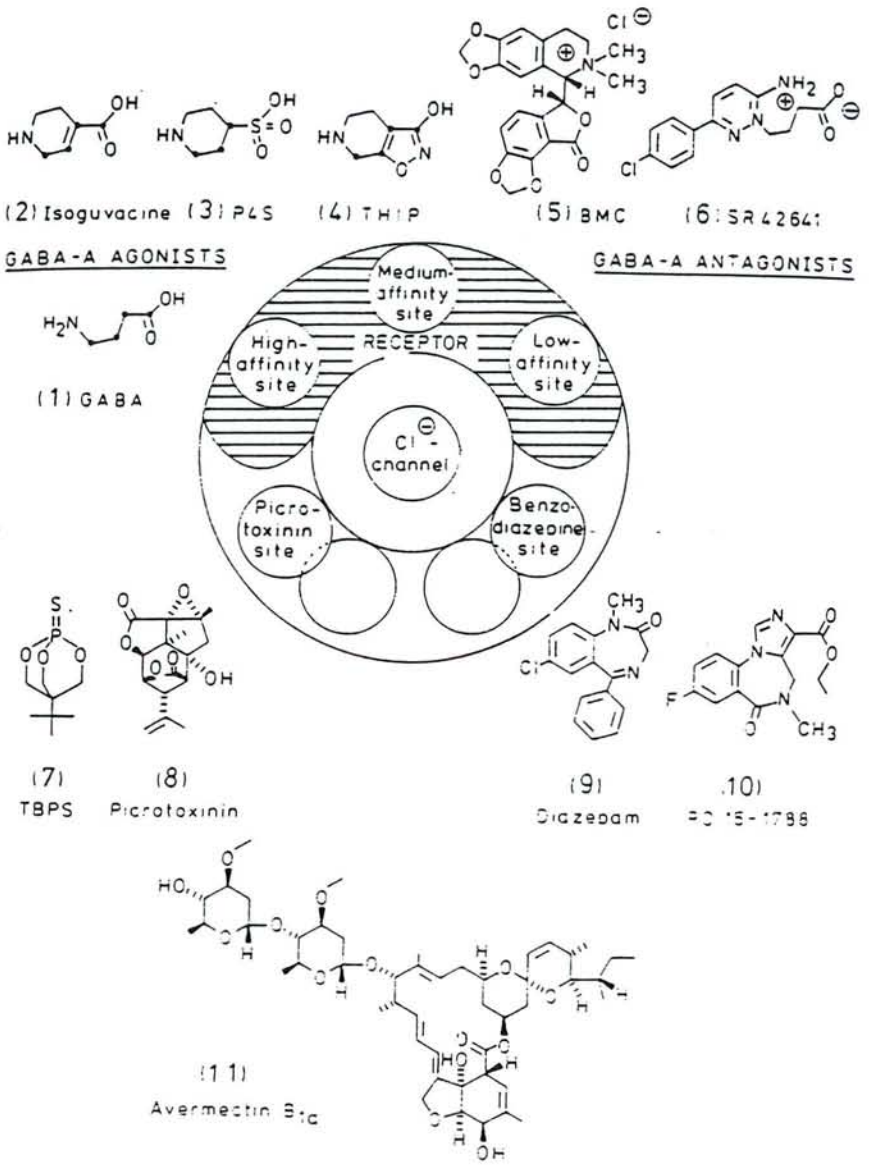


Figure 4: Illustration schématique du complexe récepteur $GABA_A$ post-synaptique et des sites d'action de certains agonistes et antagonistes $GABA_A$ et de substances agissant sur différents récepteurs subsynaptiques dans ce complexe récepteur (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

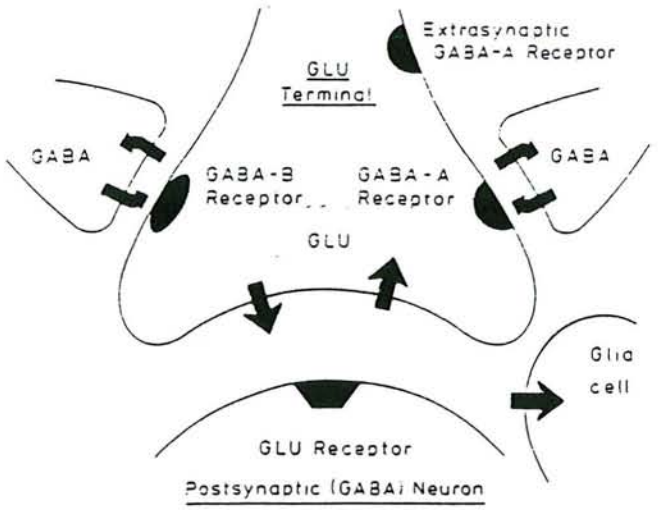


Figure 5: Illustration schématique d'une synapse glutamatergique axo-somatique contenant des récepteurs $GABA_A$ extrasynaptiques et des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ présynaptiques (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

GABAergiques (Bowery, 1983) et sur des terminaisons nerveuses de neurones utilisant d'autres neurotransmetteurs. Dans des coupes de cortex cérébelleux, le GABA augmente la libération de ^{3}H-GABA, induite par le K^+, et cet effet est sensible à la bicuculline (Bowery *et al.*, 1980).

On connaît relativement peu de choses sur la fonction physiologique et les caractéristiques pharmacologiques des récepteurs $GABA_A$ extra-synaptiques (Figures 5-6). Ces récepteurs sont sensibles aux deux antagonistes $GABA_A$, le BMC et la bicuculline, mais ont apparemment des spécificités différentes par rapport aux récepteurs synaptiques. En effet, l'activité agoniste du 4,5,6,7-tétrahydro-isoxazolo [5,4-*c*] pyridin-3-ol (THIP), un agoniste $GABA_A$ spécifique, est beaucoup plus importante sur les récepteurs synaptiques que sur les récepteurs extra-synaptiques (Johnston, 1986 ; Figure 7).

Des études neurochimiques suggèrent l'existence d'autorécepteurs $GABA_A$ (Figure 8 ; Bowery, 1983). Les démonstrations les plus convaincantes ont été réalisées *in vitro* où on a montré une libération de GABA provoquée par des agonistes GABA comme l'acide pipéridine-4-sulfonique (P4S) et le THIP, qui ne sont pas des substrats pour les mécanismes de recapture (Krogsgaard-Larsen, 1980). La sensibilité de ces récepteurs aux agonistes et antagonistes semble similaire à celle des récepteurs $GABA_A$ post-synaptiques (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Ces autorécepteurs ne semblent pas couplés à des sites récepteurs BZD (Figure 8 ; dans Squires, 1983) et pourraient jouer un rôle dans la régulation physiologique de la libération du GABA.

2. Récepteurs insensibles à la bicuculline

a. Récepteurs $GABA_B$

Dans le groupe des récepteurs GABA centraux insensibles à la bicuculline et au BMC, les récepteurs $GABA_B$ ont été les plus étudiés (Bowery, 1983). Ces récepteurs sont activés par le GABA mais, contrairement aux récepteurs $GABA_A$, ils sont activés également par le baclofène, un analogue du GABA (Figure 7). On ne connaît pas encore entièrement leur structure et leur rôle physiologique, mais ils semblent réguler la libération de neurotransmetteurs comme la noradrénaline, le glutamate ou la sérotonine, de neuropeptides et d'hormones. Les récepteurs $GABA_B$ seraient localisés principalement au niveau pré-synaptique et ils affecteraient la libération de neurotransmetteur via la régulation d'un canal Ca^{++} (Bowery, 1983). Toutefois, des récepteurs $GABA_B$ liés à des canaux K^+ ont été récemment localisés au niveau post-synaptique (Ogata *et al.*, 1987). Des récepteurs $GABA_B$ ont également été détectés dans différentes préparations de tissus périphériques, sur des terminaisons

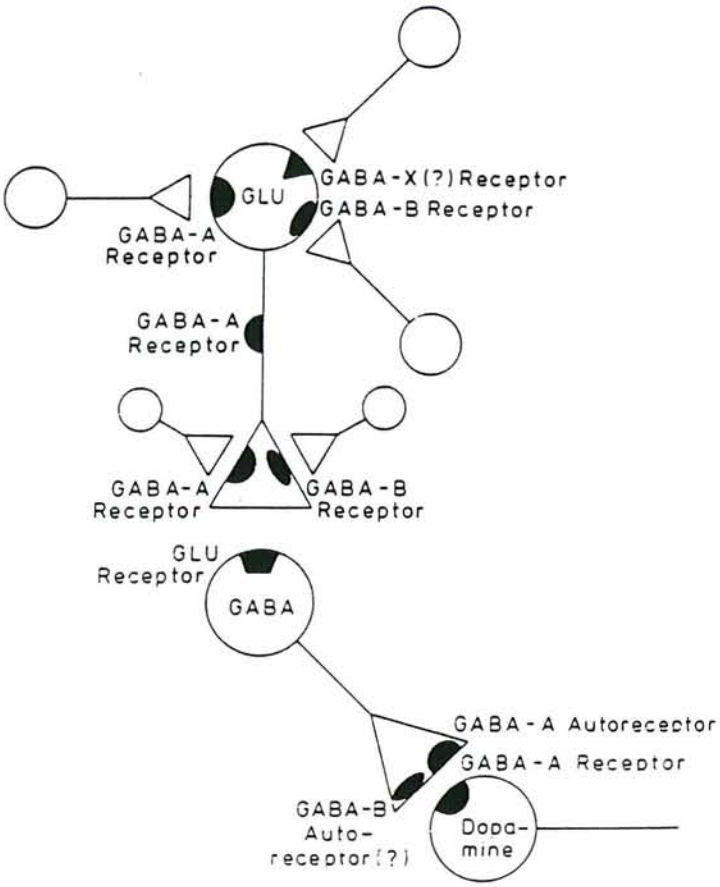


Figure 6: Illustration schématique de la multiplicité des récepteurs GABA et de la localisation des différents types de récepteurs GABA (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

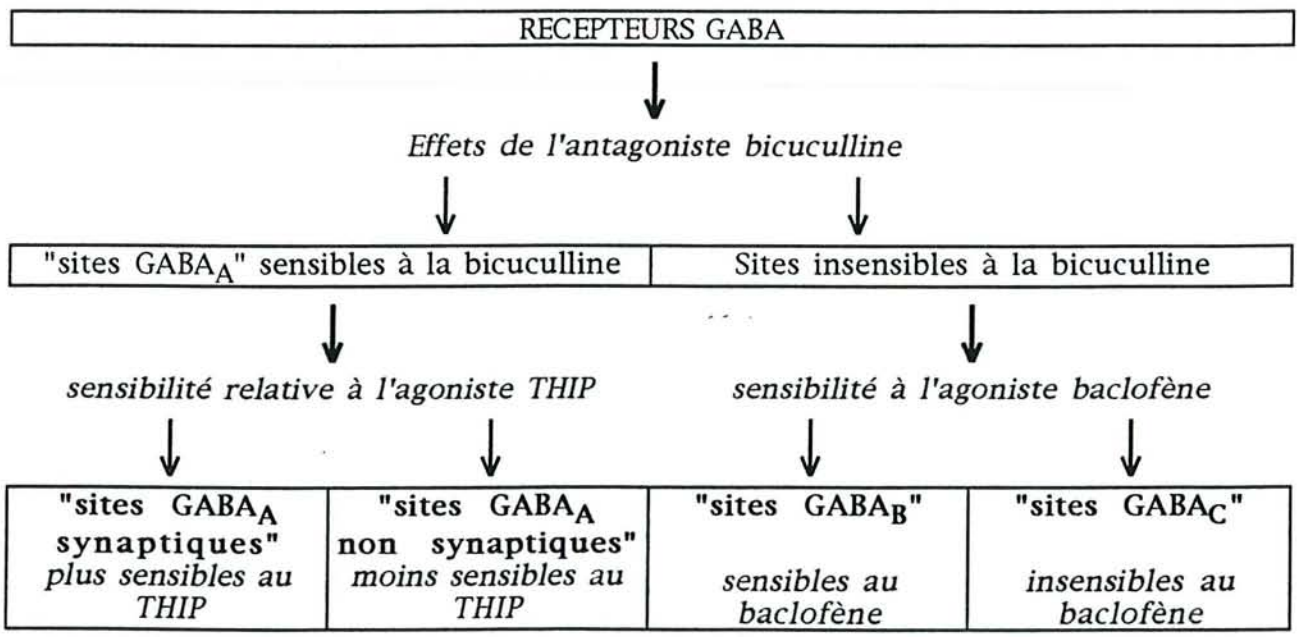


Figure 7: Proposition de classification des récepteurs GABA (d'après Johnston, 1986).

nerveuses non GABAergiques (Bowery, 1983). Par ailleurs, il existe des récepteurs $GABA_B$ pré-synaptiques sur les terminaisons GABAergiques : les autorécepteurs $GABA_B$ (Figures 6, 8). Les autorécepteurs $GABA_A$ seraient impliqués dans la libération du GABA dans la *substantia nigra pars compacta*, alors que les autorécepteurs $GABA_B$ moduleraient la libération de GABA dans la *substantia nigra pars reticulata* (dans Paredes & Ågmo, 1992).

Les récepteurs $GABA_B$ ne sont apparemment pas liés aux sites récepteurs des BZD et des barbituriques (Bowery, 1983). Parmi les effets pharmacologiques connus des récepteurs $GABA_B$, on trouve notamment l'inhibition de la libération de neurotransmetteurs, l'analgésie, l'hypothermie, la modulation des potentiels post-synaptiques inhibiteurs lents (IPSP), l'inhibition de la libération de corticolibérine et de LH et enfin, la réduction de la consolidation de la mémoire (revue dans Bowery, 1989).

Bormann (1988) a établi que le récepteur $GABA_B$ était lié soit à une phospholipase, soit à un canal K^+, soit à un canal Ca^{++}. Contrairement au récepteur $GABA_A$, l'ionophore ne ferait pas partie intégrante du récepteur $GABA_B$. Le couplage des récepteurs $GABA_B$ aux canaux ioniques se ferait directement via une protéine G et/ou indirectement via un système de messagers intracellulaires :

- Les récepteurs $GABA_B$ associés à un canal Ca^{++} inhibent la composante calcique du potentiel d'action et par ce biais, ils affectent la libération de neurotransmetteur.

- Les récepteurs $GABA_B$ associés à un canal K^+ : l'activation des récepteurs $GABA_B$ dans les cellules pyramidales de l'hippocampe augmente la conductance membranaire aux K^+ sans affecter la conductance aux Ca^{++} (Bormann, 1988). Donc, le couplage des récepteurs $GABA_B$ aux ionophores est différent dans le SNC et dans le système nerveux périphérique. L'ouverture des canaux K^+ par le GABA nécessite une protéine G activée de façon maximale par le GTP. Il existe probablement une liaison entre les récepteurs $GABA_B$ couplés à la phospholipase A2, la protéine kinase C et finalement, les canaux K^+.

b. Récepteurs $GABA_C$

Des études pharmacologiques et comportementales suggèrent l'existence de récepteurs GABA différents des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$. Différents analogues du GABA, comme par exemple l'acide cis-4-aminocrotonique, diminuent l'activité des neurones du SNC et cet effet est insensible à la bicuculline. Ces analogues inhibent la liaison du GABA mais pas la liaison du ^{3}H-(-)-baclofène (dans Paredes & Ågmo, 1992). Ces analogues présentant des similitudes structurales avec le GABA, ils ont été proposés comme représentants d'une classe d'agonistes GABA agissant sur des

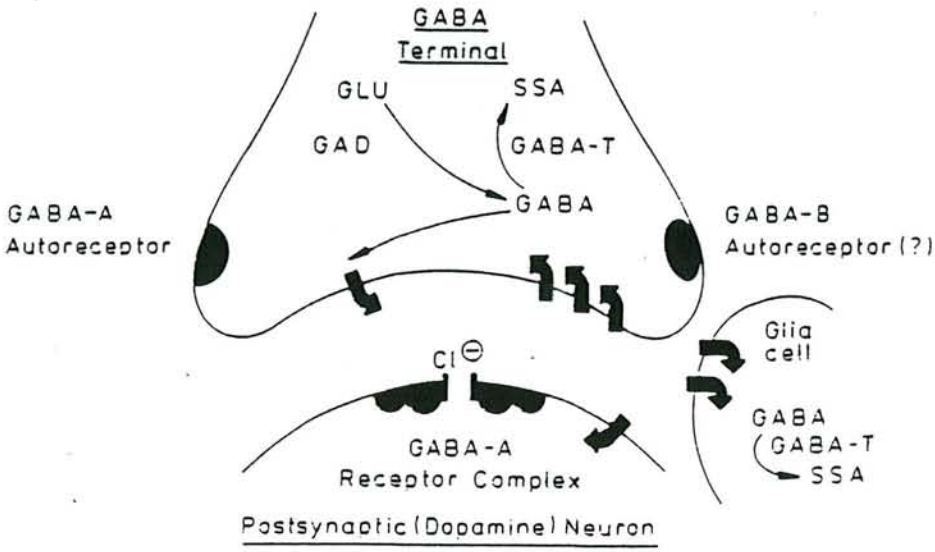


Figure 8: Illustration schématique d'une synapse GABAergique axo-somatique contenant des autorécepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

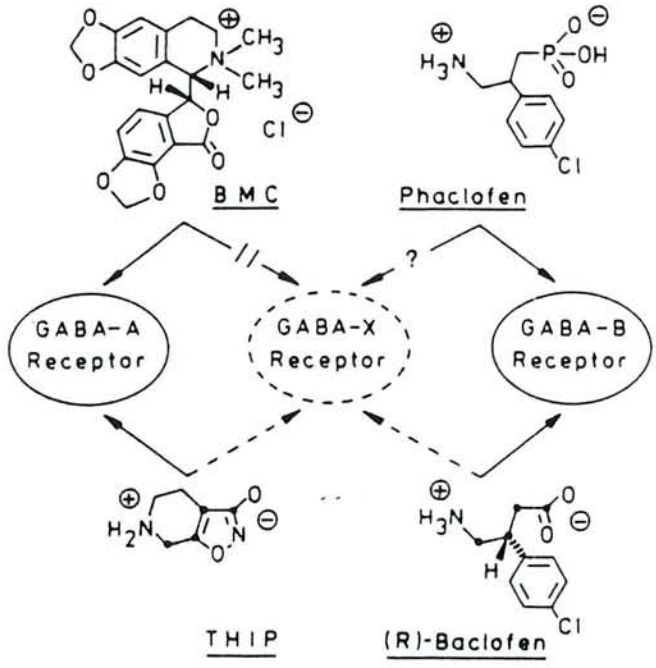


Figure 9: Illustration schématique des sous-catégories de récepteurs GABA indiquant les sites d'action de quelques agonistes et antagonistes (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988b).

récepteurs insensibles à la bicuculline et au baclofène, les récepteurs $GABA_C$ (Johnston, 1986).

Les études comportementales suggèrent également l'existence de récepteurs $GABA_C$. Le SK&F-89976-A, inhibiteur de la recapture du GABA produit, à lui seul, un réponse antinociceptive supérieure à celle produite par le traitement combiné avec le THIP et le baclofène, agonistes $GABA_A$ et $GABA_B$ respectivement (Zorumski & Isenberg, 1991). De même, le SK&F-89976-A et le γ-vinyl-GABA (également inhibiteur de la recapture du GABA) ont un effet anticonvulsivant, alors que le THIP et le baclofène ne protègent pas contre les crises induites par le pentylènetétrazole (PTZ). Par conséquent, les inhibiteurs de la recapture du GABA induiraient des effets antinociceptifs et anticonvulsivants par l'intermédiaire de la stimulation de récepteurs GABA différents des sites $GABA_A$ ou $GABA_B$ (Zorumski & Isenberg, 1991). Johnston (1986) a donc proposé une classification des récepteurs GABA, en fonction d'une part, de leur sensibilité à la bicuculline et d'autre part, de leur sensibilité au THIP ou au baclofène. Cette classification est présentée dans la Figure 7.

c. Récepteurs $GABA_X$

Les effets inhibiteurs du THIP sur le comportement sexuel et sur les fonctions motrices ne peuvent pas être bloqués par la bicuculline. Ces données renforcent l'hypothèse de l'existence de récepteurs GABA différents des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ et suggèrent que le THIP n'agirait pas uniquement sur le récepteur $GABA_A$, mais également sur un autre récepteur, le récepteur $GABA_X$ sensible au baclofène (Agmo & Giordano, 1985 ; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a,b ; Figure 9). Le récepteur $GABA_X$ est différent du récepteur $GABA_C$ proposé par Johnston (1986) puisque ce dernier est insensible au baclofène.

C. Les substances agissant sur la neurotransmission GABAergique

L'une des stratégies utilisées pour aborder le système GABAergique est de modifier son fonctionnement soit en l'inhibant soit en le stimulant. Etant donné qu'il ne franchit que très difficilement la BHE, on emploie rarement le GABA lui-même. On utilise, le plus souvent, des substances plus perméables, agissant sur un ou plusieurs mécanismes intervenant dans la neurotransmission GABAergique. Il est possible d'agir sur toutes les étapes de la transmission : synthèse, stockage, dégradation, libération ou recapture du neurotransmetteur, ou action sur les récepteurs. Un grand nombre de substances agissant sur une ou plusieurs de ces étapes ont été synthétisées.

SUBSTANCE	SITE D'ACTION	PROPRIETES	REFERENCES
muscimol	agoniste $GABA_A$, inhibe recapture gliale et neuronale	traverse la BHE, toxique, anxiolytique (i.c.v.), analgésique (souris)	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a; Sanger, 1985
thiomuscimol	agoniste $GABA_A$ presque aussi puissant que le muscimol et moins toxique, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse la BHE plus facilement encore que le muscimol	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
(*S*)-DHM	agoniste $GABA_A$ le plus puissant connu, aucune affinité pour systèmes de recapture	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
acide imidazole-4-acétique	agoniste $GABA_A$	hypnotique, analgésique	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
THIP	agoniste $GABA_A$ spécifique, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse la BHE, effets analgésiques non-opioïdes, anxiolytiques et antispasmodiques, faibles propriétés antiépileptiques accompagnées d'effets secondaires	Fonnum, 1987; Hoehn-Saric, 1983; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
thio-THIP	agoniste $GABA_A$ faible	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
5,6,7,8-tétrahydro-4H-isoxazolo-[5,4-*c*]-azépin-3-ol	agoniste $GABA_A$ très faible, antagoniste réc. glycine	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
5,6,7,8-tétrahydro-4H-isoxazolo-[4,5-*d*]-azépin-3-ol	agoniste $GABA_A$ très faible, antagoniste réc. glycine	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
4-PIOL	agoniste réc. $GABA_A$ spinaux, antagoniste réc. $GABA_A$ supraspinaux	-	Haefely, 1987
isoguvacine	agoniste $GABA_A$ puissant et spécifique, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse peu la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
acide isonipécotique	agoniste $GABA_A$ spécifique, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse peu la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
P4S	agoniste $GABA_A$ puissant et spécifique, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse peu la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
3-APS	agoniste très puissant des réc. $GABA_A$ centraux, antagoniste des réc. $GABA_B$ périphériques	aucun effet sur l'activité locomotrice	Falch *et al.*, 1986; Ågmo & Giordano, 1985
progabide	prodrogue du GABA, agoniste $GABA_A$ et $GABA_B$	traverse facilement la BHE, anticonvulsivant mais à forte dose	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
picrotoxine	antagoniste non compétitif $GABA_A$	convulsivant, augmente l'activité locomotrice	Koella, 1981; Paredes & Ågmo, 1992
PTZ	antagoniste non compétitif $GABA_A$	convulsivant	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
bicuculline	antagoniste compétitif $GABA_A$	convulsivant, augmente l'activité locomotrice	Koella, 1981; Paredes & Ågmo, 1992
BMC	antagoniste compétitif $GABA_A$	ne traverse pas la BHE, convulsivant	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a

Tableau 2: Sites d'action et effets de différents ligands du récepteur $GABA_A$.

Pour une meilleure compréhension des données existant sur le GABA, nous avons fait une liste exhaustive des agents GABAergiques disponibles et nous les avons classés en fonction du récepteur auquel ils se lient et en fonction du mécanisme qu'ils affectent (synthèse, dégradation ou recapture du GABA). La neurotransmission GABAergique peut également être affectée par des substances agissant sur des sites récepteurs différents des sites de liaison du GABA, comme par exemple les barbituriques ou les BZD. En dehors des molécules synthétiques, des ligands endogènes ont été décrits pour les sites GABA.

1. Les ligands endogènes des récepteurs GABA

Il existerait plusieurs ligands endogènes des récepteurs GABA, le plus connu étant une protéine basique, la GABA-moduline, localisée sélectivement dans les synaptosomes (Vaccarino *et al.*, 1985). La GABA-moduline inhibe, de façon compétitive, la liaison du GABA à ses sites à haute affinité. Ces diverses substances endogènes ont été regroupées sous le terme de GABARINS ("GABA-Receptor-INhibitorS") qui englobe le GABA lui-même, mais également des peptides, des phospholipides, des purines et les ions Cl^- (Johnston, 1986).

2. Les substances agissant sur les récepteurs $GABA_A$

a. Les agonistes des récepteurs $GABA_A$

Ils ont le même effet que le GABA, c'est-à-dire qu'ils se fixent sur le site de liaison du GABA et déclenchent les mêmes effets post-synaptiques (Tableau 2). Le 4,5-dihydromuscimol (DHM) est l'agoniste $GABA_A$ le plus puissant obtenu jusqu'à présent (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Le THIP, un agoniste $GABA_A$ spécifique, est présent dans le cerveau en concentrations beaucoup plus élevées que le muscimol après administration de doses équivalentes (dans Fonnum, 1987). Un grand nombre d'analogues du THIP ont été synthétisés et testés mais, mis à part le thio-THIP qui est un agoniste $GABA_A$ faible, aucun analogue n'a montré une affinité significative pour le récepteur $GABA_A$ (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Les récepteurs $GABA_A$ ne reconnaitraient donc pas seulement une partie limitée de la molécule de THIP, mais plutôt la molécule entière. Ni l'isoguvacine, ni l'acide isonipécotique, ni le THIP n'ont d'affinité pour le récepteur $GABA_B$, ce qui suggère que ces composés reflètent la conformation active du GABA sur les récepteurs $GABA_A$, et que le GABA adopte des conformations différentes selon qu'il interagisse avec les récepteurs $GABA_A$ ou $GABA_B$.

SUBSTANCE	SITE D'ACTION	PROPRIETES	REFERENCES
stéroïdes	potentiateurs des réc. $GABA_A$, potentialisent l'entrée des Cl^- provoquée par les agonistes GABA	augmentent le nombre de sites de liaison du muscimol dans différentes régions cérébrales de rats ovariectomisés	Gee *et al.*, 1987; Paredes & Ågmo, 1992
BZD	potentiateurs des réc. $GABA_A$, augmentent fréquence d'ouverture du canal Cl^-	anxiolytiques, sédatives, myorelaxantes, anticonvulsivantes	Bowery, 1983
barbituriques	potentiateurs des réc. $GABA_A$, se lient au site picrotoxine, inhibent la liaison de la picrotoxine, augmentent la liaison du GABA et des agonistes BZD à leurs sites récepteurs	sédatifs, anticonvulsivants	Fonnum, 1987

Tableau 3: Sites d'action et effets des potentiateurs du récepteur $GABA_A$.

Comme le GABA, la plupart des agonistes $GABA_A$ spécifiques ne traversent pas facilement la BHE. Toutefois, le THIP et le muscimol atteignent facilement le SNC après administration périphérique chez la souris, le rat et l'homme (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

b. Les antagonistes des récepteurs $GABA_A$

Ils sont reconnus par les récepteurs $GABA_A$ mais ne déclenchent pas les variations post-synaptiques induites par le GABA. Tous les antagonistes $GABA_A$ qui ont été étudiés sur le plan pharmacologique ont des propriétés convulsivantes (Tableau 2). Les antagonistes $GABA_A$ classiques, bicuculline et picrotoxine, ont des sites d'action différents au niveau du complexe récepteur $GABA_A$ post-synaptique (Figure 2). La picrotoxine ne se fixant pas sur le site de liaison du GABA, est donc un antagoniste non compétitif du GABA. Elle se fixerait soit directement sur la protéine canal, soit sur un site très proche du canal et empêcherait ainsi le flux entrant de Cl^-. La bicuculline et le BMC, par contre, interagissent directement avec le site GABA. Lorsqu'ils sont fixés, ils empêchent le flux entrant de Cl^-.

Le blocage et l'activation des récepteurs $GABA_A$ dans le SNC, sont stéréosélectifs (Möhler & Okada, 1977). L'isomère (1*R*, 9*S*) de la bicuculline, par exemple, est un antagoniste $GABA_A$ très faible par rapport à l'isomère (1*S*,9*R*).

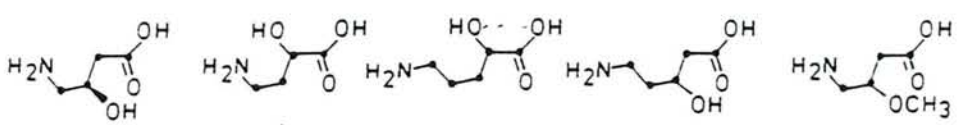
c. Les potentiateurs des récepteurs $GABA_A$

Le GABA, lorsqu'il se lie à son site de reconnaissance, provoque l'ouverture du canal Cl^-. Quand il y a simultanément liaison d'une BZD ou d'un barbiturique, l'action du GABA est renforcée grâce à une ouverture du canal Cl^- soit plus fréquente, soit prolongée, respectivement. Ces phénomènes sont dus à l'effet de coopération : la liaison du GABA ou d'un agoniste GABA à son site est renforcée par la liaison d'une des deux autres molécules (Ferrero *et al.*, 1984). L'effet inverse existe également : *in vitro*, il a été démontré que les agonistes $GABA_A$ augmentent la liaison des BZD (Braestrup *et al.*, 1980).

Il y a 3 grands groupes de potentiateurs qui agissent sur des sites différents du récepteur (Tableau 3) : les BZD, les stéroïdes et les barbituriques. Il existe, sur le complexe récepteur $GABA_A$, un récepteur pour les stéroïdes, différent des sites de liaison des BZD et du GABA (Gee *et al.*, 1987 ; Figure 2). Les barbituriques quant à eux, se lient au site picrotoxine. En concentrations faibles, ils prolongent la durée d'ouverture du canal Cl^-. Contrairement aux ligands du récepteur BZD, ils peuvent, en concentrations élevées, ouvrir le canal Cl^- même en l'absence de GABA.

SUBSTANCE	SITE D'ACTION	PROPRIETES	REFERENCES
baclofène	agoniste $GABA_B$ spécifique, le (*R*)-baclofène est le plus puissant agoniste $GABA_B$ connu	antispasmodique, anticonvulsivant, analgésique, diminue l'activité locomotrice	Bowery, 1983; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a; Ågmo & Giordano, 1985
(*R*)-GABOB	agoniste $GABA_B$ puissant	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
2-OH-DAVA	agoniste $GABA_B$	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
(*R*)-DHM	agoniste $GABA_B$, aucune affinité pour systèmes de recapture	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
progabide	prodrogue du GABA, agoniste $GABA_A$ et $GABA_B$, aucune affinité pour systèmes de recapture	traverse facilement la BHE, anticonvulsivant, efficace chez des patients spasmophiles et dépressifs, pas de propriétés anxiolytiques et très peu d'effets dans le traitement de la maladie de Huntington	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a; Fonnum, 1987
DAVA	acide aminé endogène, homologue du GABA, antagoniste des réc. $GABA_B$ périphériques, affinité pour tous les mécanismes $GABA_A$ synaptiques	-	Falch *et al.*, 1986
3-APS	antagoniste des réc. $GABA_B$ périphériques, agoniste puissant des récepteurs $GABA_A$ centraux	aucun effet sur l'activité locomotrice	Falch *et al.*, 1986; Ågmo & Giordano, 1985
phaclofène	analogue du baclofène, antagoniste $GABA_B$ à faible affinité, antagoniste des autorécepteurs GABA	-	Paredes & Ågmo, 1992
CGP-35348	antagoniste $GABA_B$	traverse la BHE	Bowery, 1989

Tableau 4: Sites d'action et effets de différents ligands du récepteur $GABA_B$.



	(*R*)-GABOB		2-OH-DAVA		
A-B	1	15	51	15	25
B-B	0.4	>100	23	>100	>100
UPT-S	67	5	>300	>300	>300

Figure 10: Structures et effets biologiques *in vitro* du (*R*)-GABOB et de quelques acides aminés apparentés. A-B et B-B: inhibition de la liaison au récepteur $GABA_A$ et $GABA_B$, respectivement; UPT-S: inhibition de la recapture synaptosomale (d'après Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

3. Les substances agissant sur les récepteurs $GABA_B$

a. Les agonistes des récepteurs $GABA_B$

Les agonistes du récepteur $GABA_B$ (Tableau 4) diminuent la fréquence de décharge des neurones dans la plupart des régions du cerveau. Ils modulent la libération des monoamines dans le SNC et dans les terminaisons nerveuses autonomes périphériques (Bowery *et al.*, 1980) :

Le baclofène est un agoniste $GABA_B$ spécifique, mais seul l'isomère (-) montre une activité d'agoniste $GABA_B$ marquée, au moins 100 fois plus grande que celle du (+)baclofène. Le baclofène est efficace en clinique dans certains types de paralysie spasmodique et a des effets analgésiques non-opioïdes. Son profil pharmacologique est différent de celui du THIP, agoniste $GABA_A$ (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Notamment, le baclofène a des propriétés anticonvulsivantes, différentes de celles du THIP ou des BZD en termes d'effets anti-crise et secondaires (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

Dans la Figure 10 sont représentés quelques analogues du GABA qui ont été testés par rapport au récepteur $GABA_B$. A l'exception de l'acide 2-hydroxy-δ-aminovalérique (2-OH-DAVA), les autres composés ne se fixent pas au site $GABA_B$ (Tableau 4). Le (*R*)-GABOB et le (*R*)-baclofène, les agonistes $GABA_B$ les plus puissants décrits jusqu'à présent, semblent refléter la conformation adoptée par le GABA durant sa liaison avec le récepteur $GABA_B$. La stéréosélectivité des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ est donc opposée, le premier fixant préférentiellement les isomères *S* des agonistes, et le deuxième fixant préférentiellement les isomères *R*.

b. Les antagonistes des récepteurs $GABA_B$

Très peu d'antagonistes $GABA_B$ spécifiques sont disponibles (Tableau 4). Les études pharmacologiques concernant le récepteur $GABA_B$ ainsi que le développement d'agents thérapeutiques sont limités par le fait que la plupart des antagonistes du récepteur $GABA_B$ ne traversent pas la BHE. Toutefois, un antagoniste $GABA_B$ traversant la BHE a été décrit récemment par Bittiger *et al.*, le CGP-35348 (1989 dans Bowery, 1989). Le récepteur $GABA_B$ n'est bloqué ni par la picrotoxine ni par la bicuculline.

L'une des causes majeures de certains désordres neurodégénératifs serait une hyperactivité du glutamate, neurotransmetteur central excitateur (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a) et, cette libération de glutamate pourrait être régulée par l'intermédiaire d'une sous-classe de récepteurs $GABA_B$, les récepteurs $GABA_B$ pré-synaptiques, situés sur les terminaisons des neurones glutamatergiques (Bowery, 1983). Le baclofène activerait apparemment tous les récepteurs $GABA_B$

SUBSTANCE	SITE D'ACTION	PROPRIETES	REFERENCES
γ-vinyl-GABA	inhibiteur de la GABA-T	anticonvulsivant vis-à-vis de la bicuculline, inefficace contre les MES, antiépileptique en clinique	Piredda *et al.*, 1987 Fonnum, 1987
GAG	inhibiteur spécifique de la GABA-T	réduction dose-dépendante de la locomotion (rat)	Agmo & Giordano, 1985
isoniazide	son métabolite actif, l'hydrazine inhibe la GABA-T	améliore la situation psychiatrique dans la maladie de Huntington	Fonnum, 1987
acide hydrazino--propionique	inhibiteur de la GABA-T	-	Fonnum, 1987
valproate	inhibiteur de la GABA-T	anticonvulsivant, traverse la BHE	Pop *et al.*, 1991
AOAA	inhibiteur de la GABA-T	porte atteinte à l'exécution harmonieuse des actes de locomotion	Fonnum, 1987; Koella, 1981
3-MP	inhibiteur de la GAD	-	Fonnum, 1987
D,L-allylglycine	inhibiteur de la GAD	-	Fonnum, 1987

Tableau 5: Sites d'action et effets des inhibiteurs des enzymes du métabolisme du GABA.

SUBSTANCE	SITE D'ACTION	PROPRIETES	REFERENCES
muscimol	agoniste $GABA_A$, inhibe recapture gliale et neuronale	traverse la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
THPO	inhibiteur spécifique de la recapture gliale	traverse la BHE de façon limitée anticonvulsivant (rongeurs)	Schousboe *et al.*, 1986 Croucher *et al.*, 1983
acide nipécotique	inhibiteur spécifique de la recapture neuronale et gliale	traverse difficilement la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
ester éthylique de l'acide nipécotique	prodrogue de l'acide nipécotique, inhibiteur spécifique de la recapture neuronale et gliale	traverse facilement la BHE, anticonvulsivant (rongeurs)	Croucher *et al.*, 1983
SK&F-89976-A	analogue DPB de l'acide nipécotique, inhibiteur spécifique de la recapture neuronale et gliale	traverse facilement la BHE, effets antinociceptifs, anticonvulsivant	Yunger *et al.*, 1984; Schwark & Löscher, 1985
guvacine	inhibiteur spécifique de la recapture neuronale et gliale	traverse difficilement la BHE	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
acide 3-pyrroline-3-carboxylique	agoniste $GABA_A$ faible, inhibe recapture neuronale et gliale	-	Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a
SK&F-100330-A	analogue DPB de la guvacine, inhibiteur spécifique de la recapture neuronale et gliale	traverse facilement la BHE, effets antinociceptifs, anticonvulsivant	Yunger *et al.*, 1984; Schwark & Löscher, 1985

Tableau 6: Sites d'action et effets des inhibiteurs de la recapture du GABA.

(Sawynok, 1986), c'est pourquoi on recherche actuellement des agonistes spécifiques de ces récepteurs pré-synaptiques, ce qui permettrait de réduire l'activation excessive, par le glutamate, des neurones dans le cerveau. De plus, il semblerait que la libération de neurotransmetteurs monoaminergiques, comme la dopamine, la sérotonine et la noradrénaline, soit également régulée par des récepteurs $GABA_B$ pré-synaptiques (Bowery, 1983). En principe, l'administration d'antagonistes $GABA_B$ stimulerait la libération de tels neurotransmetteurs, ce qui pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans certaines maladies psychiatriques.

4. Les inhibiteurs des enzymes du métabolisme du GABA

Diverses substances inhibent l'enzyme de dégradation du GABA (GABA-T) (Tableau 5). Le γ-vinyl-GABA semble être l'un des plus intéressants inhibiteurs de la GABA-T, puisqu'il peut être employé oralement et qu'il a une action assez spécifique (dans Fonnum, 1987). Injecté dans le cortex prépiriforme, il multiplie par quatre le taux de GABA local et exerce un effet anticonvulsivant vis-à-vis de crises induites par une injection i.v. de bicuculline, mais il est inefficace contre les crises maximales induites par électrochoc (MES)(Piredda *et al.*, 1987). En clinique, ce composé s'est avéré efficace chez des patients épileptiques (dans Fonnum, 1987).

La GABA-T peut donc être inhibée par différentes substances et son inhibition aboutit à une forte augmentation des concentrations cérébrales en GABA. Toutefois, cette enzyme est largement distribuée dans le SNC, il est donc probable que son inhibition augmentera surtout la concentration en GABA extra-synaptique. De plus, le GABA libéré par les synapses est inactivé principalement par les systèmes de recapture et non par son catabolisme. Mais, jusqu'à la découverte très récente d'inhibiteurs de la recapture franchissant la BHE, il n'existait pas d'autre possibilité, pour élever efficacement les taux centraux de GABA, que d'employer ces inhibiteurs de la GABA-T. Par ailleurs, malgré l'apparition d'agonistes et d'antagonistes spécifiques permettant d'affecter spécifiquement une ou plusieurs sous-catégories de récepteurs GABA, il est toujours intéressant, en particulier pour les études comportementales, d'utiliser dans un premier temps, des substances qui augmentent les taux de GABA (par exemple : inhibiteurs de la GABA-T ou de la recapture du GABA) et ensuite, si un effet est observé, d'utiliser des substances spécifiques d'un sous-type de récepteur.

A l'inverse, pour diminuer l'activité GABAergique, on peut utiliser le 3-mercaptopropionate (3-MP) et la D,L-allylglycine (Tableau 5) qui inhibent la synthèse du GABA en agissant sur la GAD.

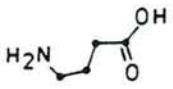
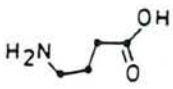
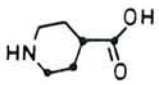
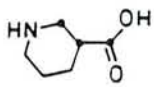
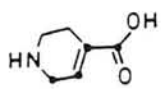
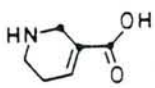
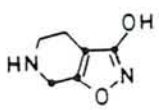
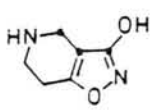
GABA ET AGONISTES $GABA_A$ SPECIFIQUES		GABA ET INHIBITEURS DE LA RECAPTURE DU GABA SPECIFIQUES		
COMPOSE	A-B	COMPOSE	UPT-S	N/G
	0.03		3	2.3
GABA		GABA		
	0.3		6	0.5
ACIDE ISONIPECOTIQUE		ACIDE NIPECOTIQUE		
	0.04		5	0.25
ISOGUVACINE		GUVACINE		
	0.1		160	0.07
THIP		THPO		

Figure 11: Etude comparative de la relation structure-activité chez certains analogues du GABA. A-B: inhibition de la liaison au récepteur $GABA_A$; UPT-S: inhibition de la recapture synaptosomale; N/G: rapport entre les affinités pour la recapture neuronale (N) et gliale (G) du GABA, une valeur élevée indiquant une sélectivité pour la recapture neuronale, et une valeur faible indiquant une sélectivité pour la recapture gliale (d'après Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

5. Les inhibiteurs de la recapture du GABA

L'inhibition des mécanismes de recapture représente un moyen intéressant pour stimuler la neurotransmission GABAergique. Les mécanismes de reprélèvement, au niveau des neurones et des cellules gliales, ont des spécificités différentes en ce qui concerne leurs substrats et leurs inhibiteurs (Tableau 6 ; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1987). Les inhibiteurs de la recapture neuronale ont des propriétés convulsivantes et les inhibiteurs sélectifs de la recapture gliale ont des effets anticonvulsivants (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1987).

Pour agir uniquement sur les mécanismes de recapture, il fallait d'abord séparer l'affinité pour les récepteurs $GABA_A$ de l'affinité pour les systèmes de recapture. Le muscimol, par exemple, possède ces deux affinités. En le transformant en thiomuscimol ou en (*S*)-DHM, on élimine l'affinité pour le système de recapture, sans perdre l'activité d'agoniste $GABA_A$. En transformant le muscimol en THIP ou en THPO (4,5,6,7-tétrahydro-isoxazolo-[4,5-*c*]-pyridin-3-ol), on constate que le THIP est un agoniste $GABA_A$ uniquement (Tableau 2), alors que le THPO est spécifiquement un inhibiteur de la recapture (Tableau 6, Figure 11). Il en est de même pour l'isoguvacine et la guvacine, ou pour l'acide isonipécotique et l'acide nipécotique (Figure 12). L'acide isonipécotique, l'isoguvacine et le THIP reflètent la conformation active du GABA sur les récepteurs $GABA_A$. En ce qui concerne l'acide nipécotique, la guvacine et le THPO, aucune partie de ces molécules d'inhibiteurs de la recapture du GABA ne reflète exactement la molécule de GABA (Figures 11-12). On peut en déduire que le GABA adopte des conformations différentes lorsqu'il se lie soit au récepteur $GABA_A$ soit au transporteur.

L'acide nipécotique est un puissant inhibiteur de la recapture neuronale et gliale. Il est légèrement plus puissant pour la recapture gliale, comme le montre le rapport entre l'affinité pour la recapture neuronale et gliale, N/G, de 0.5 (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a ; Figure 11). La guvacine a un profil pharmacologique pratiquement similaire, mais c'est un inhibiteur de la recapture gliale un peu plus sélectif (rapport N/G de 0.25).

Une grande partie des inhibiteurs de la recapture du GABA traversent difficilement la BHE. La guvacine et l'acide nipécotique, par exemple montrent des effets pharmacologiques très faibles après administration systémique. Des prodrogues et des analogues de l'acide nipécotique et de la guvacine ont donc été développés (Tableau 6). Les esters éthyliques de ces composés, par exemple, sont des prodrogues efficaces, mais ils ont également des effets cholinergiques, ce qui limite leur utilisation. Toutefois, l'ester éthylique de l'acide nipécotique traverse la BHE après administration systémique, il est ensuite hydrolysé et libère le composé parent dans le cerveau en 30 mn (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). En rajoutant un groupement 4,4-diphényl-3-butényl (DPB) sur l'atome d'azote de l'acide nipécotique

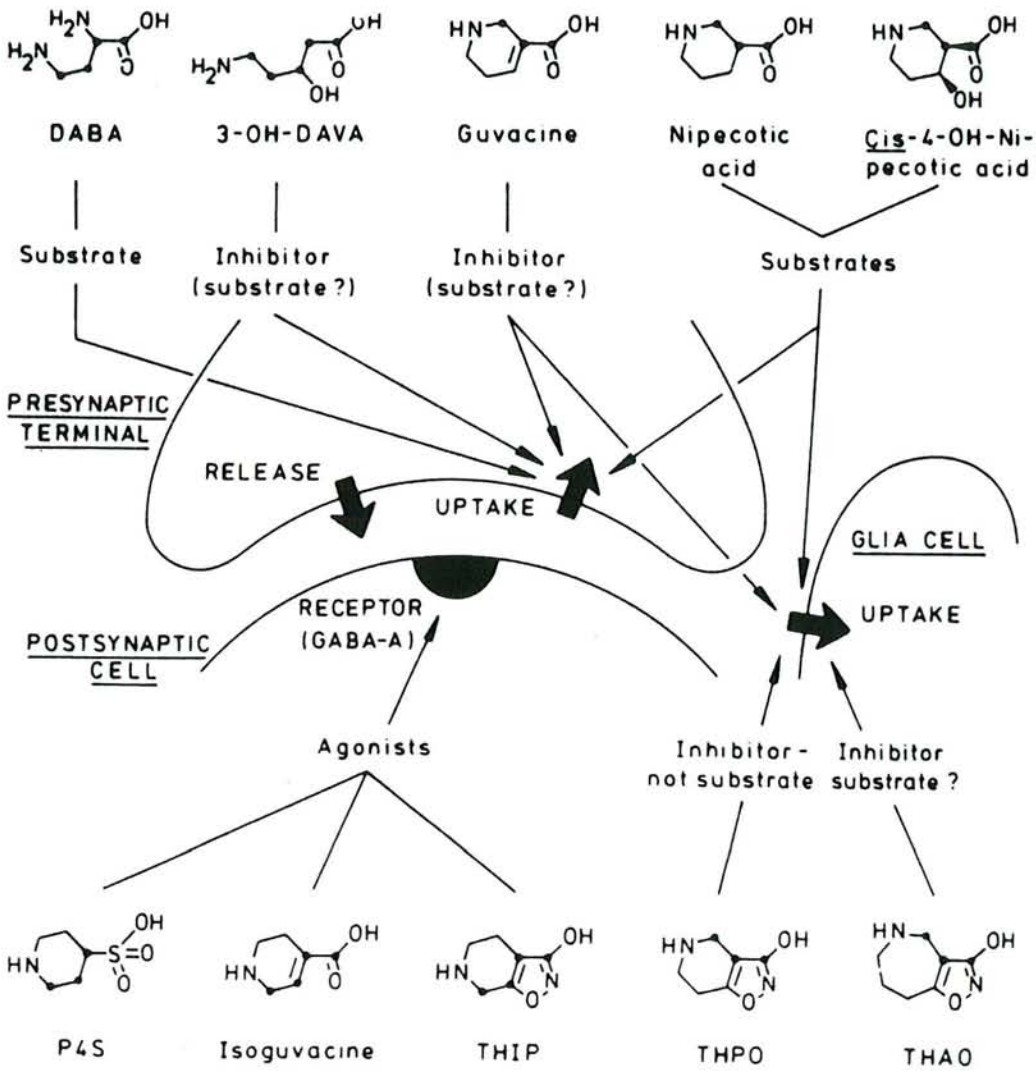
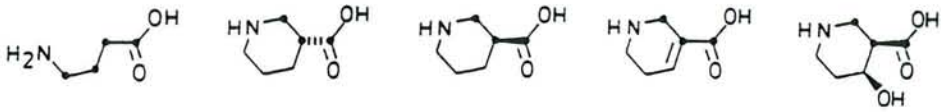


Figure 12: Illustration schématique d'une synapse axo-somatique GABAergique montrant les sites d'action d'un certain nombre d'agonistes $GABA_A$ et d'inhibiteurs de la recapture du GABA (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988b).

et de la guvacine, on obtient des analogues plus efficaces que les composés d'origine à la fois *in vitro*, en ce qui concerne l'inhibition de la recapture du GABA par des synaptosomes et *in vivo* (Yunger *et al.*, 1984). Les analogues DPB de l'acide nipécotique et de la guvacine sont le SK&F-89976-A et le SK&F-100330-A, respectivement (Tableau 6, Figure 13). Ces composés traversent la BHE grâce à la très grande lipophilie du groupement DPB, ce qui permet d'étudier leurs effets pharmacologiques après administration systémique. Le SK&F-89976-A et le SK&F-100330-A ont des effets antinociceptifs et sont des inhibiteurs puissants des convulsions induites par le PTZ chez le rat (Yunger *et al.*, 1984). Le deuxième composé protège également les rats contre les MES, mais aucun des deux n'affecte ni les MES ni les convulsions induites par le PTZ chez la souris (Yunger *et al.*, 1984). Or, les MES et les convulsions induites par le PTZ, chez le rat et la souris, sont considérées comme des indicateurs de l'efficacité anticonvulsivante chez l'homme (Yunger *et al.*, 1984), il est donc difficile de prédire leurs effets antiépileptiques. Le SK&F-100330-A et le SK&F-89976-A ont montré, chez la gerbille épileptique, des effets anticonvulsivants plus puissants que ceux de l'ester éthylique de l'acide nipécotique (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). De plus, le SK&F-100330-A et le SK&F-89976-A produisent des effets anticonvulsivants dose-dépendants sur les crises provoquées chez des rats par embrasement des noyaux amygdaliens, et, contrairement au DZP, ces composés n'induisent pas d'effets sédatifs significatifs aux doses anticonvulsivantes (Schwark & Löscher, 1985). Les profils anticonvulsivants du SK&F-89976-A et du SK&F-100330-A sont résumés dans le Tableau 7.

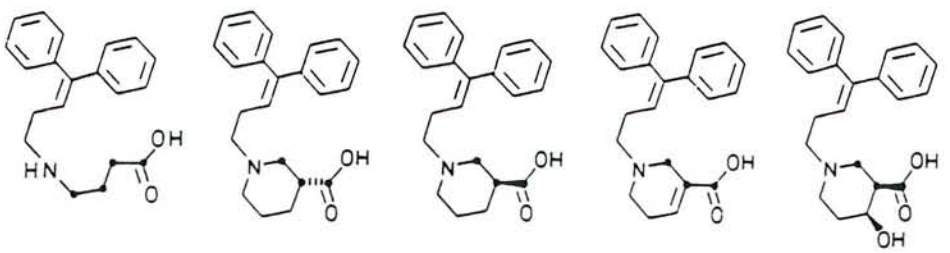
En résumé, un grand nombre de composés ayant des actions spécifiques sur différents mécanismes synaptiques GABAergiques ont été synthétisés au cours des dix dernières années. Plusieurs d'entre eux se sont avérés très prometteurs dans le traitement de l'épilepsie, la spasmophilie, l'anxiété et la dépression. En raison du large éventail d'action du système GABAergique, des effets secondaires comme la sédation apparaissent et posent des problèmes. Le THIP a été le sujet de nombreuses études pharmacologiques, et, en clinique humaine, il a montré des effets intéressants (Tableau 2). Toutefois, il ne présente que de faibles propriétés antiépileptiques, accompagnées d'effets secondaires tels que la sédation et l'ataxie, ce qui le rend inacceptable pour la thérapie humaine (Hoehn-Saric, 1983). De nouveaux types d'agonistes $GABA_A$ sont indispensables, peut-être des agonistes partiels, produisant le même profil pharmacologique, mais dépourvus de la composante sédative. Le 4-PIOL, par exemple, est un composé intéressant puisqu'il montre un profil d'agoniste $GABA_A$ nouveau, sans effet sur le couplage GABA/BZD (Tableau 2). Le nouveau type de composés représenté par le SK&F-100330-A et le SK&F-89976-A, ayant des effets anticonvulsivants importants chez l'animal, est très intéressant, par rapport au THIP qui a des propriétés anticonvulsivantes très faibles ou au progabide qui doit être

ACIDES AMINES PARENTS



	GABA	acide (*R*)-nipécotique	acide (*S*)-nipécotique	Guvacine	acide cis-4-OH-nipécotique
UPT-S	2.6	1.7	9.9	4.9	4.6

ANALOGUES DPB



		SK&F -89976-A	SK&F -89976-A	SK&F -100330-A	
UPT-S	17	0.11	1.9	0.20	0.26

Figure 13: Etude comparative de la relation structure-activité chez certains inhibiteurs de la recapture du GABA et de leurs analogues DPB (4,4-diphényl-3-buténYl). UPT-S: inhibition de la recapture synaptosomale (d'après Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

Méthode d'induction de la crise	Espèce	ED_{50} anticonvulsivante (mg/kg)						Références
		SK&F-89976-A		SK&F-100330-A		DZP		
		i.p.	p.o.	i.p.	p.o.	i.p.	p.o.	
Bicuculline	Rat	11.3		6.4		0.48		Löscher 1986a; Yunger *et al.* 1984
Strychnine	Rat	>32		>30		2.5		Löscher 1986a; Yunger *et al.* 1984
PTZ	Rat	6.3	8.5	1.8	5.8	0.6	1.7	Löscher 1986a; Yunger *et al.* 1984
PTZ	Souris				>15		≈0.4	Yunger *et al.* 1984
MES	Rat	>30	60	15	11.4	5	5.6	Löscher 1986a,b; Yunger *et al.* 1984
MES	Souris		>200		>200		10	Löscher 1986a,b; Yunger *et al.* 1984
Embrasement amygdalien	Rat	15		4.6		1.9		Löscher 1986a; Schwark & Löscher 1985
Jet d'air	Gerbille	4.1		1.6		0.22		Löscher 1986a,b

Tableau 7: Valeurs des ED_{50} anticonvulsivantes du SK&F-89976-A, du SK&F-100330-A et du DZP (d'après Löscher, 1986a,b).

administré à de très fortes doses pour provoquer des réductions significatives des symptômes chez les patients épileptiques. De plus, le fait que les effets anticonvulsivants du SK&F-100330-A présentent moins d'effets sédatifs que le DZP, est très prometteur.

D. Implications physiologiques des récepteurs GABA

Les récepteurs $GABA_A$ sont distribués dans presque tout le système nerveux des mammifères. Il semblerait que les récepteurs $GABA_A$ extra-synaptiques soient impliqués dans la régulation fine de l'excitabilité des cellules.

Les récepteurs $GABA_B$ seraient impliqués dans la neurodépression (dans Fonnum, 1987) et dans la paralysie spasmodique. Dans le SNC, ils provoquent un courant sortant de K^+ qui est inhibiteur, tout comme le courant Cl^- des récepteurs $GABA_A$. Le contrôle négatif par la protéine kinase C pourrait être en relation avec d'autres neurotransmetteurs comme la sérotonine. En effet, la sérotonine augmente le taux intracellulaire de diacylglycérol qui active la protéine kinase C. La protéine kinase C pourrait également stimuler l'activité phospholipase A2. Il n'existe apparemment pas de synapses GABAergiques hors du SNC. Cependant, de nombreux auteurs ont noté la présence de récepteurs $GABA_B$ sur des terminaisons nerveuses autonomes périphériques (Bowery, 1983). Dans tous les cas, leur activation diminue la libération de neurotransmetteur excitateur dans la synapse, et diminue ainsi, la réponse post-synaptique. Toutefois, l'activation de ces récepteurs ne bloque jamais complètement la libération de neurotransmetteur, on a seulement observé une réduction de 50% (Bowery, 1983). La libération de neurotransmetteur au niveau synaptique met en jeu des flux calciques. Or, le GABA inhibe les courants calciques. Donc, il semblerait que les récepteurs $GABA_B$ pré-synaptiques contrôlent la transmission synaptique en inhibant la libération de neurotransmetteur.

E. Les voies GABAergiques

Les synapses GABAergiques sont vitales pour le fonctionnement du SNC. En effet, une dépression du fonctionnement synaptique GABAergique peut provoquer une hyperexcitabilité, des convulsions et la mort. Le GABA est largement distribué dans toutes les régions du SNC sauf dans la substance blanche, les concentrations les plus élevées en GABA s'observant dans le *globus pallidus*, la *substantia nigra* et l'hypothalamus. 20 à 40% des terminaisons nerveuses peuvent contenir ce neurotransmetteur (Matsumoto, 1989). Donc, dans le SNC, un grand nombre de neurones utilisent le GABA comme neurotransmetteur. C'est pourquoi il est difficile d'établir des voies purement GABAergiques.

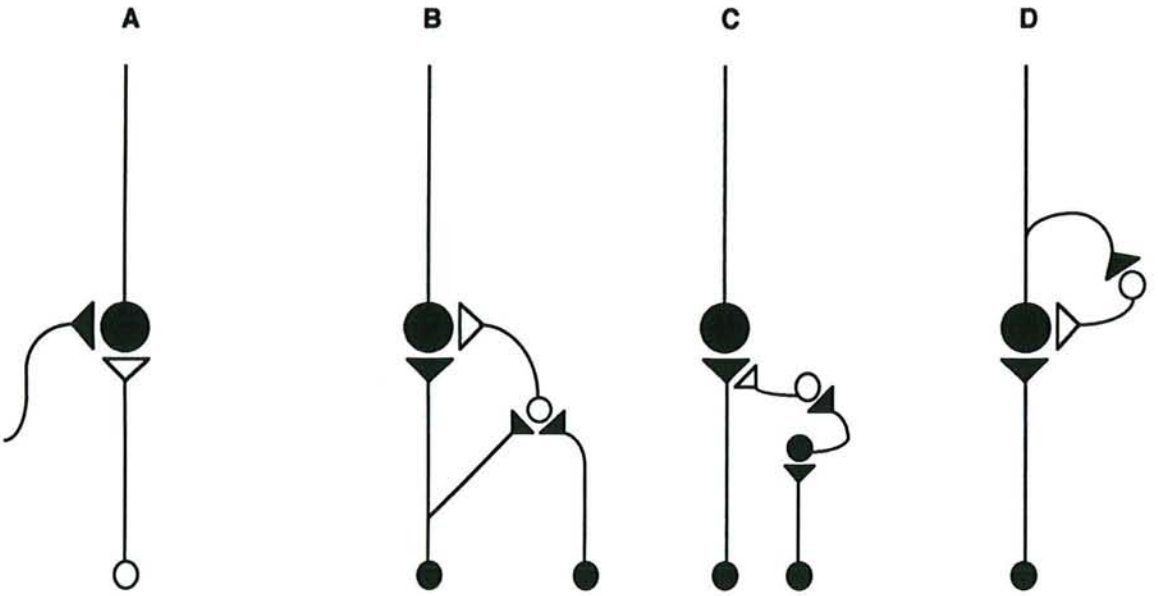


Figure 14: Quatre connexions synaptiques caractéristiques des neurones GABAergiques (en blanc). Les neurones excitateurs sont représentés en noir. C: inhibition présynaptique; D: rétro-inhibition (d'après Haefely, 1987).

Il existe des voies neuronales GABAergiques, formées de neurones principaux ayant leurs corps cellulaires dans une région du cerveau et leurs terminaisons sur des neurones principaux ou des interneurones dans une autre région. Citons par exemple, les cellules de Purkinje du cortex cérébelleux, et la majeure partie des neurones efférents du néostriatum. Mais, la plupart des neurones GABAergiques sont des interneurones, localisés dans des circuits neuronaux, exerçant leur effet inhibiteur dans leur environnement immédiat, de manière directe ou rétroactive. Les neurones GABAergiques forment des connexions synaptiques caractéristiques dans les circuits neuronaux du SNC (Figure 14). Un type de connexion synaptique intervient dans ce qu'on nomme l'inhibition pré-synaptique (Figure 14C) : une terminaison GABAergique forme une synapse avec la terminaison d'un neurone sensoriel excitateur, et l'effet du GABA, dans cette synapse axo-axonale, est une réduction de la quantité de transmetteur excitateur libérée en réponse à l'arrivée d'un potentiel d'action. Ce type d'inhibition permet de réduire certaines stimulations d'un neurone sans modifier sa capacité de réponse à d'autres stimulations. Un autre type d'arrangement synaptique des interneurones GABAergiques intervient dans la rétro-inhibition (ou inhibition feedback) d'un neurone excitateur principal (Figure 14D) : à chaque fois que ce neurone envoie un potentiel d'action, il active l'interneurone GABAergique qui se reprojette sur ce même neurone principal. Ce type d'inhibition récurrente prévient l'activation excessive des neurones principaux et stabilise l'activité neuronale.

1. Les neurones GABAergiques dans le cortex cérébral

On pensait généralement que le GABA contenu dans le néocortex provenait exclusivement de neurones locaux puisqu'en séparant le cortex des couches inférieures, on n'observait pas de réduction des paramètres GABA, c'est-à-dire des concentrations en GAD et en GABA, principalement. Mais des études immunohistochimiques récentes ont montré une projection GABAergique de l'hypothalamus au néocortex (dans Fonnum, 1987). L'étude de la morphologie des cellules GABAergiques dans le néocortex a mis en évidence une grande variété de cellules tachetées ("stained cells") dans toutes les couches du cortex. La plupart des cellules sont des cellules non-épineuses ("aspinous cells") et quelques-unes sont des cellules épineuses étoilées ("spinous stellate cells") (dans Fonnum, 1987). On trouve également des cellules en corbeille (dans Fonnum, 1987) et des cellules en lustre ("chandelier cells") (dans Fonnum, 1987). Ces interneurones GABAergiques sont impliqués dans l'inhibition récurrente des cellules pyramidales ainsi que dans l'inhibition directe (Figure 15a ; Haefely & Polc, 1983).

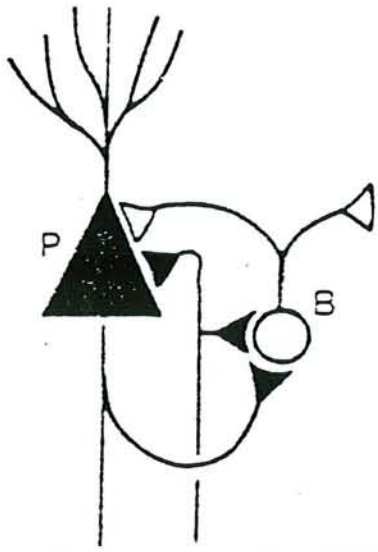
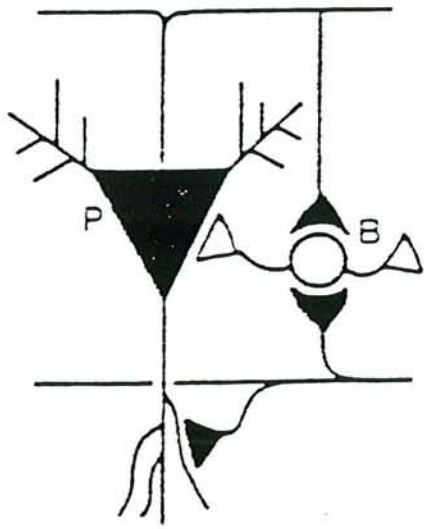
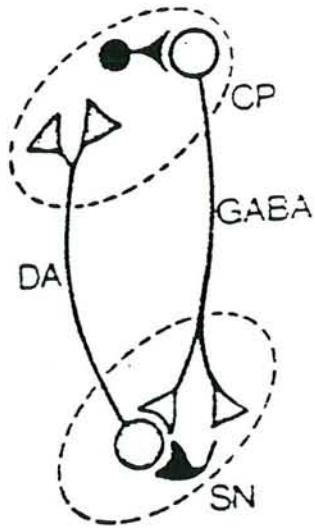
a  	**Cortex cérébral:** Les collatérales récurrentes des cellules pyramidales (P) activent les cellules en corbeille GABAergiques (B) modulant la rétroinhibition. Si on remplace la cellule pyramidale par une cellule granulaire, ce diagramme s'applique à l'inhibition récurrente localisée dans le gyrus dentate.
b  	**Hippocampe:** Les collatérales récurrentes des cellules pyramidales (P) activent les cellules en corbeille GABAergiques (B). En plus de cette boucle rétroactive, des afférences extrinsèques peuvent également faire synapse avec l'interneurone inhibiteur, et former une boucle inhibitrice directe.
c  	**Voies GABAergiques:** Elles débutent dans le noyau caudé et le putamen (CP) et rejoignent les neurones dopaminergiques (DA) de la *substantia nigra* (SN).

Figure 15: Diagramme schématique de certaines voies GABAergiques typiques. Les neurones GABAergiques sont indiqués en blanc et les neurones excitateurs en noir (d'après Haefely & Polc, 1983).

2. Les neurones GABAergiques dans l'hippocampe

Dans l'hippocampe, des études biochimiques ont révélé la présence de GAD principalement dans deux couches, la couche granulaire/pyramidale et la couche moléculaire (dans Fonnum, 1987). La plupart de l'activité GAD est due à des neurones locaux. Plus précisément, on observe une forte densité de GAD et de GABA autour des cellules pyramidales et granulaires, qui correspond aux terminaisons axonales des cellules en corbeille (Figure 15b). Chaque cellule en corbeille entre en contact avec des centaines de cellules pyramidales. Les cellules en corbeille sont des interneurones inhibiteurs GABAergiques. La stimulation d'une cellule pyramidale provoque par rétroaction, l'inhibition de cette même cellule pyramidale et le blocage d'autres cellules pyramidales qui n'ont pas été stimulées. Le système septo-hippocampal serait responsable du contrôle de l'anxiété (Gray, 1988).

3. Les neurones GABAergiques dans les ganglions basaux (noyaux gris centraux)

La localisation et la fonction du GABA ont été très étudiées dans les ganglions basaux, en raison de leur implication dans plusieurs désordres neurologiques. On trouve des taux de GABA moyens dans le noyau caudé et le putamen, et des taux élevés dans le *globus pallidus*, la *substantia nigra* et le noyau pédonculaire (Fonnum, 1987). Dans le noyau caudé et le putamen, il s'agit de neurones locaux et de neurones se projetant dans la *substantia nigra* (Figure 15c). Dans le *globus pallidus*, le GABA est localisé dans des terminaisons qui entourent les corps cellulaires et les dendrites d'autres neurones. En fait, l'activité GABA dans le *globus pallidus* provient des cellules du noyau caudé et du putamen (Fonnum, 1987). De plus, des neurones GABAergiques en provenance du noyau subthalamique aboutissent dans le *globus pallidus* et inversement, le *globus pallidus* envoie une projection GABAergique vers le noyau subthalamique.

Dans la *substantia nigra*, l'activité GABA provient d'un petit nombre de neurones locaux dans la *substantia nigra pars reticulata*, mais surtout de neurones partant du striatum (voie GABAergique striatonigrale), et pour une part mineure, de neurones du putamen et du noyau caudé (Figure 15c). En effet, la voie extrapyramidale est presque entièrement GABAergique. Elle relie le striatum à la *substantia nigra pars reticulata*. Dans ce cas, il ne s'agit pas d'interneurones, mais d'axones longs. Dans la *substantia nigra pars compacta*, environ 80% des terminaisons nerveuses sont GABAergiques, et on peut estimer que chaque corps cellulaire et chaque dendrite dans la *substantia nigra* est associé à des terminaisons GABAergiques (dans Fonnum, 1987). Les cellules GABAergiques de la *substantia nigra*

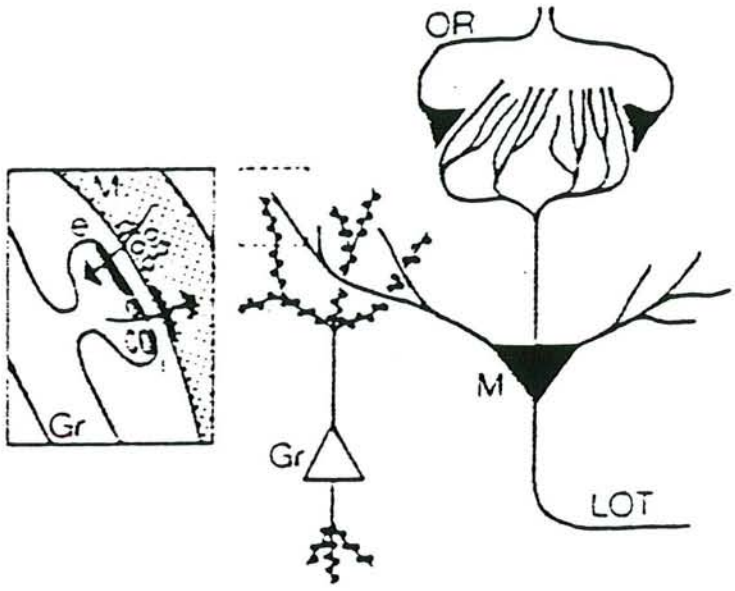
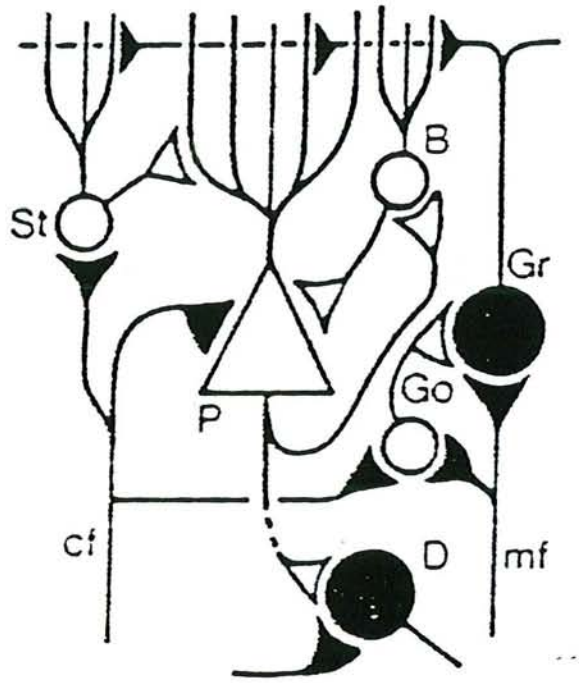
d  	**Bulbe olfactif:** Les axones des neurones récepteurs olfactifs (OR) excitent, par une voie monosynaptique, les cellules mitrales (M) dont les axones forment le tractus olfactif latéral (LOT). Une synapse dendro-dendritique réciproque (bi-directionnelle), entre une cellule mitrale (en pointillé) et l'épine d'une cellule granulaire GABAergique (Gr), est représentée dans l'encart.
e  	**Cortex cérébelleux et noyau de Deiters:** Les deux afférences excitatrices du cortex cérébelleux sont les fibres grimpantes (cf) et les fibres moussues (mf). Le seul neurone efférent, la cellule de Purkinje (P), est excité par les fibres grimpantes et par les fibres parallèles, ces dernières étant les axones des cellules granulaires (Gr). Les fibres parallèles excitent également les dendrites des cellules étoilées (St), des cellules en corbeille (B) et des cellules de Golgi (Go). Les axones des cellules de Purkinje inhibent, par une voie monosynaptique, des neurones du noyau vestibulaire latéral de Deiters (D).

Figure 15 suite: Diagramme schématique de certaines voies GABAergiques typiques. Les neurones GABAergiques sont indiqués en blanc et les neurones excitateurs en noir (d'après Haefely & Polc, 1983).

se projettent dans le colliculus supérieur, dans certains noyaux thalamiques et dans l'aire tegmentale.

Le *nucleus accumbens* et les bulbes olfactifs contiennent plus de GABA que le noyau caudé et le putamen. Il s'agit d'interneurones locaux mais également de neurones se projetant dans le *globus pallidus* (dans Fonnum, 1987). Les cellules mitrales représentent la principale voie efférente du bulbe olfactif. Les dendrites des cellules mitrales forment des synapses dendro-dendritiques réciproques avec les épines dendritiques des cellules granulaires, qui sont dépourvues d'axones (Figure 15d ; Haefely & Polc, 1983). Cet arrangement synaptique réciproque est unique, l'excitation des dendrites de la cellule granulaire par un potentiel d'action dans la cellule mitrale ne nécessitant pas la genèse d'un potentiel d'action dans la cellule granulaire, mais seulement un phénomène local dans l'épine dendritique.

Le thalamus n'est pas particulièrement riche en GABA, le noyau réticulé constituant la source majeure de neurones GABAergiques. Ces derniers se projettent dans les autres régions du thalamus (dans Fonnum, 1987). Par ailleurs, le thalamus reçoit des terminaisons GABAergiques provenant de la *substantia nigra pars reticulata* (Fonnum, 1987).

L'hypothalamus est une région riche en GABA, en particulier l'aire hypothalamique préoptique et l'aire hypothalamique antérieure (dans Fonnum, 1987). D'ailleurs, certaines expériences suggèrent que le GABA modifie la sécrétion d'un grand nombre d'hormones adéno- et neurohypophysaires et de neuro-hormones hypothalamiques, en particulier l'ACTH, l'hormone de croissance, l'hormone lutéinisante et la prolactine (Paredes et Ågmo, 1992 ; revue dans Racagni & Donoso, 1986).

4. Les neurones GABAergiques dans l'amygdale

Dans l'amygdale, qui joue un rôle majeur dans l'agressivité, le GABA est plus concentré dans les noyaux phylogéniquement anciens (noyaux médian, cortical et ventral) que dans les noyaux plus récents (noyaux latéral et basolatéral) (dans Fonnum, 1987).

5. Les neurones GABAergiques dans le cervelet

Dans le cervelet, les cellules de Purkinje, les cellules étoilées, les cellules en corbeille et les cellules de Golgi utilisent le GABA (Figure 15e) :

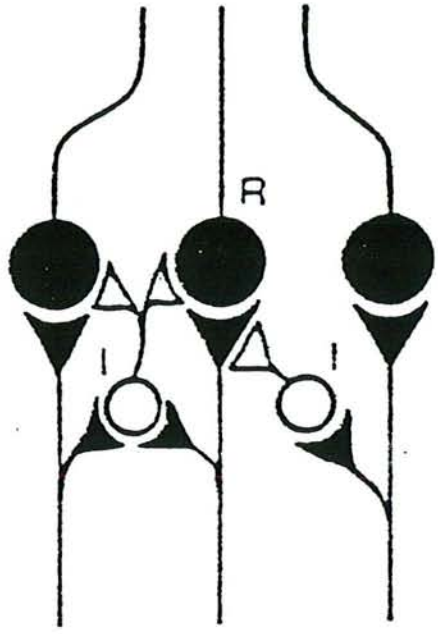
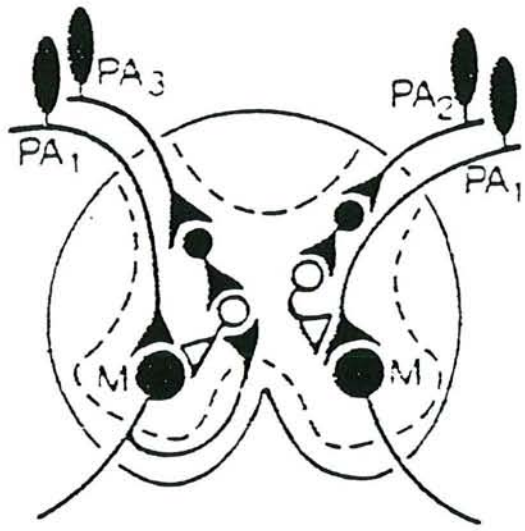
f 	**Noyaux dorsaux:** Les fibres de la colonne dorsale excitent des cellules relais (R) par une voie monosynaptique. Des collatérales des afférences primaires font synapse avec des interneurones GABAergiques qui effectuent une inhibition post-synaptique (à gauche) et présynaptique (à droite) des cellules relais.
g 	**Moelle épinière:** A droite de la figure, sont présentées les voies inhibitrices présynaptiques. PA1 est une fibre musculaire afférente excitant par une voie monosynaptique, un motoneurone M. PA2 représente un neurone sensoriel cutané faisant synapse avec un interneurone excitateur qui, à son tour, active l'interneurone GABAergique qui forme une synapse axo-axonale avec la terminaison PA1. A gauche, sont représentées deux voies inhibitrices post-synaptiques. Une collatérale récurrente du motoneurone active des interneurones (les cellules de Renshaw) dont un certain nombre sont GABAergiques et qui modulent la rétroinhibition. Le neurone PA3 représente une fibre musculaire afférente en provenance d'un muscle antagoniste à PA1; via une voie disynaptique, il produit une inhibition post-synaptique directe du motoneurone. En réalité, la cellule de Renshaw n'est pas identique à l'interneurone (glycinergique) intercalé dans la voie inhibitrice antagonistique.

Figure 15 suite: Diagramme schématique de certaines voies GABAergiques typiques. Les neurones GABAergiques sont indiqués en blanc et les neurones excitateurs en noir (d'après Haefely & Polc, 1983).

a. Les cellules de Purkinje

Le cortex cérébelleux est une région particulièrement riche en neurones GABAergiques. Les cellules de Purkinje (Figure 15e) sont de gros neurones situés dans l'écorce cérébelleuse. Elles constituent la seule voie efférente du cervelet. Les fibres et les axones des cellules de Purkinje entrent en contact synaptique avec les neurones localisés dans les noyaux cérébelleux profonds et les noyaux vestibulaires, en particulier le noyau de Deiters. Si on stimule les cellules de Purkinje, on obtient une hyperpolarisation des cellules de ces noyaux et ce sont des récepteurs $GABA_A$ qui interviennent.

b. Les interneurones cérébelleux

Les fibres grimpantes (cf) et les fibres moussues (mf) sont les deux seules voies afférentes au cervelet, et elles sont excitatrices (Figure 15e). Tous les interneurones inhibiteurs qui entrent en contact directement ou indirectement avec les cellules de Purkinje, utilisent le GABA : il s'agit des cellules étoilées, des cellules en corbeille et des cellules de Golgi. Un seul type de neurones utilise un autre neurotransmetteur, ce sont les cellules granulaires glutamatergiques. Si on stimule électriquement la surface du cervelet, on excite les fibres parallèles des cellules granulaires. Un stimulus isolé active d'abord les neurones de Purkinje et ensuite, par l'inhibition des cellules étoilées et des cellules en corbeille, produit une période de silence dans les cellules de Purkinje.

6. Les neurones GABAergiques dans le bulbe rachidien

Le noyau du raphé contient un taux de GABA relativement élevé. Cette activité GABA proviendrait d'interneurones et de neurones sérotonergiques (Fonnum, 1987). En effet, le GABA et la sérotonine coexisteraient dans certains neurones sérotonergiques du raphé (dans Fonnum, 1987). De plus, l'injection d'agonistes GABA dans les noyaux du raphé réduit le turnover de la sérotonine dans toutes les régions contenant des terminaisons sérotonergiques (dans Fonnum, 1987). Cet effet serait dû à une action des interneurones GABAergiques sur les cellules sérotonergiques dans les noyaux du raphé. D'autre part, comme le montre la Figure 15f, il existe, dans les noyaux dorsaux, des interneurones GABAergiques effectuant une inhibition pré- ou post-synaptique.

Les informations concernant les fibres GABAergiques dans les autres régions mésencéphaliques sont peu nombreuses. On trouve une activité GABA dans la matière grise périaqueducale. Les noyaux oculo-moteurs reçoivent une afférence GABAergique en provenance des noyaux vestibulaires supérieurs (dans Fonnum,

1987). Le noyau cochléaire présente une forte activité GABA : les cellules en roue de charrette ("cartwheel cells"), les cellules étoilées, les cellules de Purkinje et probablement les cellules de Golgi sont GABAergiques (dans Fonnum, 1987). Les afférences cardio-pulmonaires aboutissent dans le noyau du tractus solitaire. Cette région innerve fortement les neurones du bulbe rachidien ventral rostral et ventrolatéral caudal. Dans le bulbe rachidien ventral rostral, le GABA et le muscimol réduisent la pression artérielle alors que la bicuculline l'augmente. Dans le bulbe rachidien ventrolatéral caudal, les effets sont opposés (dans Fonnum, 1987).

7. Les neurones GABAergiques dans la moëlle épinière

Les neurones GABAergiques dans la moëlle épinière sont en général des neurones intraspinaux à axone court. Les terminaisons GABAergiques modulent l'inhibition pré-synaptique des terminaisons afférentes primaires (dans Fonnum, 1987) et certains interneurones GABA sont impliqués dans l'inhibition post-synaptique (Figure 15g).

8. Le GABA dans les tissus périphériques

Chez les mammifères, les organes périphériques présentant des taux élevés en GABA ou en GAD sont les cellules β des îlots pancréatiques où ils coexistent avec l'insuline, mais également l'oviducte, le rein, le système nerveux entérique et les trompes de Fallope. On ne connaît pas encore les fonctions du GABA dans ces tissus. Dans l'intestin et les ovaires, on trouve également du GABA, mais en faibles concentrations (Fonnum, 1987). Dans les ovaires, il a été montré que le GABA ne se trouvait pas dans des cellules nerveuses. Par contre, le GABA entérique est localisé dans des cellules nerveuses. Dans la majorité des autres tissus, la localisation exacte n'a pas encore été déterminée. Les mécanismes d'inactivation et de libération du GABA semblent communs aux neurones centraux et périphériques (dans Paredes et Ågmo, 1992).

Les agents GABAergiques modifient la motilité intestinale en agissant directement sur le système nerveux entérique. En effet, le muscimol inhibe la motilité intestinale *in vivo* s'il est administré par voie systémique mais n'a aucun effet s'il est infusé dans les ventricules cérébraux (dans Paredes et Ågmo, 1992). Par contre, le baclofène stimule la motilité duodénale après administration centrale et périphérique, suggérant ainsi un site d'action central. L'effet périphérique de l'agoniste $GABA_A$ pourrait être important dans le contrôle de la prise alimentaire. De même, les effets centraux de l'agoniste $GABA_B$ pourraient jouer un rôle dans la prise alimentaire mais de manière indirecte, l'effet primaire étant la modification de la motilité intestinale.

Au niveau des ovaires, le GABA augmente la sécrétion d'œstradiol et réduit celle de progestérone (dans Paredes et Ågmo, 1992). De tels effets pourraient être d'une grande importance dans les études du comportement sexuel des rats femelles. De plus, cet effet local sur les ovaires pourrait être accentué par les effets du GABA sur la sécrétion hypophysaire des gonadotrophines.

En ce qui concerne les organes reproducteurs mâles, le canal déférent des souris et des cochons d'Inde possède des récepteurs $GABA_B$ et on a trouvé du GABA dans les testicules, l'épididyme, le canal déférent, la prostate et les vésicules séminales (dans Paredes et Ågmo, 1992). Le rôle fonctionnel du GABA dans les glandes sexuelles accessoires est inconnu, mais il a été montré que le GABA stimulait la production testiculaire d'androgènes et augmentait la réponse aux gonadotrophines.

Les agents GABAergiques modifient également la libération de catécholamines et de peptides de type enképhaline par les surrénales. De plus, les cellules chromaffines contiennent de la GAD et sont capables de synthétiser, stocker libérer et inactiver le GABA. Les effets directs du GABA sur la production d'hormones par les surrénales pourraient devenir importants dans les situations où le stress constitue une part majeure de la procédure expérimentale.

En résumé, il serait opportun d'établir quels effets comportementaux des agents GABAergiques sont modulés par le SNC ou par des actions périphériques, avant d'attribuer les effets de ces agents au SNC. Notons que la technique des GABA-SLC devrait permettre d'éliminer en grande partie les effets périphériques puisque très peu de GABA serait libéré au niveau périphérique.

F. Effets comportementaux du GABA

La pharmacologie et la biochimie du GABA ont fait l'objet de plusieurs revues (Tapia, 1983 ; Fonnum, 1987 ; Lloyd & Morselli, 1987). Par contre, en ce qui concerne les données comportementales de base sur le GABA, très peu de revues ont été faites en dehors d'une revue très récente (Paredes & Ågmo, 1992). De plus, les effets comportementaux peuvent être très différents en fonction des sous-catégories de récepteurs GABA concernées. Très peu de données comportementales prenant en compte les récepteurs sont disponibles, mais cette lacune tend à être comblée grâce aux nombreuses substances GABAergiques spécifiques des différents récepteurs aujourd'hui disponibles.

Le GABA est impliqué dans la régulation d'un grand nombre de mécanismes physiologiques, y compris la sécrétion d'un certain nombre d'hormones (Racagni & Donoso, 1986). Les effets physiologiques du GABA peuvent influencer le comportement et doivent donc être pris en compte lors des études comportementales. Avant de développer les effets comportementaux du GABA, citons quelques exemples

d'effets physiologiques du GABA pouvant induire des modifications comportementales.

Le premier exemple concerne les effets du GABA sur l'hypophyse : la libération de toutes les hormones pituitaires est susceptible d'être modifiée par le GABA. Les effets endocrines du GABA peuvent donc être très complexes et avoir des conséquences multiples sur le comportement.

De même, les agents GABAergiques montrent des effets sur la thermorégulation susceptibles d'influencer la balance énergétique et par conséquent, la prise de nourriture. Le comportement alimentaire est effectivement sous contrôle GABAergique (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Plusieurs études ont montré que des inhibiteurs de la GABA-T induisaient une réduction dose-dépendante et durable de la prise alimentaire mais à des doses inférieures à celles qui modifient la température corporelle ou les fonctions motrices (Cooper *et al.*, 1980). Il semble donc que les effets anorexiques ne soient pas secondaires aux effets sur les fonctions motrices ou sur la thermorégulation. D'autres études employant, non pas des inhibiteurs de la GABA-T, mais des agonistes GABA comme le muscimol, montrent une augmentation de la prise de nourriture et il apparaît que la majorité des données publiées soit en faveur d'une stimulation de la prise alimentaire par les agonistes GABA, plutôt qu'une inhibition.

Le GABA joue également un rôle dans le contrôle des fonctions cardio-vasculaires (DiMicco *et al.*, 1984). Une injection intracérébroventriculaire (i.c.v.) de THIP réduit la pression sanguine et le rythme cardiaque alors qu'une injection systémique de THIP n'affecte pas significativement ces fonctions. D'autre part, l'administration systémique de GABA ou d'isoguvacine a des effets cardio-vasculaires significatifs, qui peuvent être bloqués par le BMC. Etant donné que le THIP est capable de traverser la BHE, contrairement au GABA et à l'isoguvacine, ces résultats indiquent que des récepteurs GABA périphériques interviennent dans la régulation cardio-vasculaire. Le GABA et certains agonistes GABA produisent une dilatation dose-dépendante de segments artériels isolés de chat et de chien, apparemment par l'activation de récepteurs GABA ayant des caractéristiques pharmacologiques similaires à celles des récepteurs GABA post-synaptiques centraux (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

Par ailleurs, des études pharmacologiques montrent que le GABA joue un rôle dans la spasmophilie (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a,b). En clinique, le baclofène et le THIP sont efficaces dans certains types de paralysie spasmodique. Ces effets pourraient s'expliquer par une action sur l'inhibition pré-synaptique des réflexes monosynaptiques dans la moëlle épinière.

1. Effets anticonvulsivants du GABA

Les origines de l'épilepsie peuvent être multiples. Dans certains cas, il s'agit d'une diminution des taux de GABA et dans d'autres, d'une augmentation des taux d'acides aminés excitateurs. L'analyse d'échantillons de tissu cérébral prélevés à proximité de foyers de crise sur certains patients épileptiques ou sur des animaux rendus épileptiques, a révélé une atteinte sévère du système GABAergique (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Dans différents modèles de l'épilepsie, on a également mesuré de faibles taux de GAD et une réduction de la capacité de prélèvement de GABA, ces observations reflétant probablement des stades plus ou moins avancés de dégénérescence des neurones GABAergiques (Olsen *et al.*, 1985). Par ailleurs, chez la gerbille sensible aux convulsions, la densité en récepteurs GABA/BZD est plus faible dans le cerveau moyen que chez la gerbille résistante aux convulsions et cette diminution pourrait contribuer à l'apparition des convulsions (Olsen *et al.*, 1985). Ainsi, de nombreux auteurs ont suggéré que le GABA jouait un rôle important dans les activités convulsivantes (exemple : Tower, 1976 ; Woodbury, 1980) et anticonvulsivantes (exemple : Piredda *et al.*, 1987).

Différentes revues sur les données concernant le GABA et l'épilepsie ont été réalisées (Lippa *et al.*, 1980 ; Löscher, 1982 ; Lloyd & Morselli, 1987) montrant qu'une réduction du fonctionnement des synapses GABAergiques produisait des convulsions. Le blocage direct des récepteurs $GABA_A$ par la bicuculline ou la picrotoxine, ou encore l'inhibition de la synthèse du GABA par des inhibiteurs de la GAD produisent des crises (dans Paredes & Ågmo, 1992). Pourtant, le THIP et le muscimol sont inefficaces dans certains modèles animaux de l'épilepsie (Löscher & Schwark, 1985 ; Paredes & Ågmo, 1992), le THIP étant toujours deux à cinq fois moins efficace que le muscimol. Toutefois, chez la souris atteinte d'une épilepsie déterminée génétiquement, le THIP, administré par voie systémique, supprime efficacement la crise (Löscher, 1982) et, chez les souris DBA/2, il réduit les crises audiogèniques (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Contrairement aux agonistes $GABA_B$ comme le baclofène, les agonistes $GABA_A$ ont des effets anticonvulsivants, mais leur profil anticonvulsivant est plus réduit que les substances provoquant une activation non spécifique de la transmission GABAergique. Parmi ces substances, les inhibiteurs de la recapture du GABA comme le SK&F-89976-A ont des propriétés anticonvulsivantes plus importantes que les inhibiteurs de la GABA-T. Il semblerait que les effets anticonvulsivants des inhibiteurs de la recapture du GABA soient liés à l'activation de récepteurs GABA différents des récepteurs $GABA_A$ et $GABA_B$ (dans Paredes & Ågmo, 1992).

La *substantia nigra* est l'un des sites où le GABA exerce ses effets anticonvulsivants, probablement en interférant avec la propagation de la crise (Gale, 1985). Mais, les crises ne peuvent pas être initiées dans la *substantia nigra*

avec des antagonistes GABA. C'est pourquoi il doit y avoir au moins une autre région dans le SNC où des changements dans la transmission GABAergique peuvent déclencher des crises. Gale & Piredda (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a) ont identifié une petite région dans le cortex prépiriforme profond du rat, qu'ils ont appelée "*area tempestas*", à partir de laquelle des crises motrices bilatérales sont provoquées par application directe de très petites quantités de bicuculline (Piredda *et al.*, 1985). La transmission GABAergique pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la genèse des crises dans cette région (dans Piredda *et al.*, 1987) et par conséquent, dans le développement de crises en réponse à une déficience de la transmission GABAergique. En effet, lorsqu'on injecte dans le cortex prépiriforme du γ-vinyl-GABA, un inhibiteur de la GABA-T, le taux de GABA local est multiplié par quatre et on observe un effet anticonvulsivant vis-à-vis de crises induites par une injection i.v. de bicuculline (Piredda *et al.*, 1987). Par contre, le γ-vinyl-GABA est inefficace contre les MES (Piredda *et al.*, 1987), qui elles, ne dépendent pas du cerveau antérieur mais du tronc cérébral (dans Piredda *et al.*, 1987).

Chez l'homme, plusieurs substances GABAergiques sont efficaces dans le traitement de l'épilepsie (Lloyd & Morselli, 1987), mais ces effets anticonvulsivants s'accompagnent souvent d'effets sédatifs et ataxiques. C'est pourquoi la caractérisation des sous-catégories de récepteurs GABA impliquées s'avère indispensable pour le développement de composés antiépileptiques plus spécifiques et applicables en clinique.

2. Rôle du GABA dans d'autres désordres neurologiques et psychiatriques

La découverte du rôle important joué par des dysfonctions du GABA dans certains désordres neurologiques et psychiatriques a suscité un intérêt grandissant pour la pharmacologie du GABA :

Des taux anormalement faibles de GABA et de GAD ont été mesurés dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Uhlhaas *et al.*, 1986) et dans des tissus cérébraux post-mortem de patients atteints de la chorée de Huntington, en particulier dans les ganglions basaux (Hamel *et al.*, 1981). De plus, des études neurochimiques ont mis en évidence des anomalies des récepteurs GABA dans certaines régions des cerveaux de patients choréiques (Kish *et al.*, 1983). Malheureusement, l'utilisation thérapeutique d'agents GABAergiques comme le progabide, le THIP et le muscimol s'est avérée inefficace jusqu'à présent (revue dans Lloyd & Morselli, 1987).

L'hémiballisme, une autre chorée violente, présente une déficience du système GABAergique dans les noyaux subthalamiques et le *globus pallidus* (Fonnum, 1987).

De nombreuses études ont montré des dysfonctions du GABA dans la schizophrénie, et plus précisément au niveau des interactions complexes entre le GABA et la dopamine. Une étude, réalisée en 1975, a consisté à administrer du baclofène à des schizophrènes et a donné des résultats prometteurs (dans Paredes & Ågmo, 1992). Toutefois, les études suivantes ont donné des résultats controversés, y compris avec le baclofène. Les études rapportant une diminution des symptômes schizophrèniques sont aussi nombreuses que celles qui rapportent le contraire (dans Paredes & Ågmo, 1992). L'intervention du GABA dans la schizophrénie a tout de même été confirmée récemment par des études de "binding" qui ont révélé des anomalies du récepteur GABA dans les cerveaux autopsiés de schizophrènes chroniques (Hanada *et al.*, 1987). De plus, Thanker *et al.* (1987) ont observé une diminution du taux de GABA dans le LCR de patients schizophrènes. Mais pour l'instant, les agonistes GABA ne sont plus employés comme antipsychotiques.

Plusieurs auteurs ont proposé une contribution du GABA aux symptômes des patients parkinsoniens (exemple : Lloyd *et al.*, 1975). En effet, on note une diminution du taux de GABA dans les ganglions basaux et le LCR de patients parkinsoniens non traités (Lloyd *et al.*, 1975) et, durant le traitement à la L-dopa, ces taux redeviennent normaux (Hornykiewicz *et al.*, 1976).

Enfin, il faut mentionner que, dans la maladie d'Alzheimer, on note une diminution du binding du GABA, mais l'efficacité des agents GABAergiques dans le traitement de cette maladie n'a pas encore été évaluée (dans Paredes & Ågmo, 1992).

En résumé, les substances GABAergiques sont encore très peu utilisées en clinique, en dehors du traitement de l'épilepsie.

3. Rôles du GABA dans la dépression

Les monoamines occupent une position centrale dans l'étude des mécanismes et du traitement de la dépression. Toutefois, une contribution du GABA aux symptômes des patients dépressifs a été suggérée par Petty & Coffman (1984). De plus, on a trouvé des taux de GABA plus faibles dans le LCR (dans quatre études sur six) et dans le plasma (dans six études sur six) de patients dépressifs (dans Fonnum, 1987). On a également montré que plusieurs substances antidépressives augmentaient le nombre de récepteurs $GABA_B$ (dans Fonnum, 1987). Des études cliniques préliminaires ont montré de bons résultats chez des patients dépressifs avec le progabide et la fengabine, un composé agissant apparemment sur les systèmes GABAergiques (Lloyd *et al.*, 1987). Ainsi, de plus en plus de preuves

s'accumulent en faveur de l'implication du GABA dans la dépression (dans Fonnum, 1987) et il semblerait que les agents GABAergiques offrent des perspectives plus prometteuses pour les désordres affectifs comme la dépression et les désordres maniaques que pour les autres maladies mentales majeures.

4. Rôles du GABA dans l'alcoolisme

Des taux de GABA plasmatique remarquablement faibles ont été mesurés chez des alcooliques (Petty & Coffman, 1984) et l'éthanol aurait des effets sévères sur les récepteurs GABA (Rastogi *et al.*, 1986). L'effet du THIP sur les symptômes de l'état de manque d'éthanol a été étudié chez le rat (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). L'administration centrale de THIP réduit les crises audiogèniques tonico-cloniques mais n'a aucun effet sur le tremblement des pattes antérieures.

5. Effets du GABA sur l'agressivité

Le comportement agressif est également sous contrôle GABAergique (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). On a constaté que les rats tuant les souris sont caractérisés par des niveaux plus faibles de GABA dans les bulbes olfactifs et le septum par rapport aux rats non tueurs. Des injections locales de GABA ou d'inhibiteurs de la GABA-T peuvent bloquer ce type de comportement agressif alors qu'une injection de bicuculline ou de picrotoxine peut induire le comportement muricide (Puglisi-Allegra, 1981). L'injection i.c.v. de THIP induit un comportement muricide chez 60% des rats non tueurs, alors que l'injection i.c.v. de bicuculline supprime le comportement muricide des rats tueurs (dans Paredes & Ågmo, 1992). De même, l'augmentation des réponses agressives produite par l'isolation sociale des souris est associée à une diminution de la concentration en GABA dans le septum, le striatum et les bulbes olfactifs (dans Paredes & Ågmo, 1992). L'activation des récepteurs GABA augmente les comportements offensifs, le blocage de ces récepteurs induit des réactions de défense et l'activité GABAergique dans la substance grise périaqueducale joue un rôle critique dans l'augmentation des comportements défensifs face à un intrus (dans Paredes & Ågmo, 1992). En résumé, l'augmentation de la neurotransmission GABAergique facilite le comportement muricide alors que la réduction de la neurotransmission GABAergique induit le comportement de fuite et des réponses agressives. Une activité tonique des systèmes GABAergiques pourrait donc maintenir l'organisme dans des "limites normales" d'agression et de défense si bien que, quand les taux de GABA sont accrus, un comportement agressif apparaît et quand les taux de GABA sont réduits, un comportement défensif a plus de chance d'apparaître dans un contexte de conflit (Paredes & Ågmo, 1992).

6. Effets du GABA sur le comportement reproducteur

Les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de l'expression du comportement sexuel pourraient être une cible pour les agents GABAergiques. De plus, il existe une interaction entre les stéroïdes et le complexe récepteur $GABA_A$ (dans Paredes & Ågmo, 1992). Par exemple, l'œstradiol et la progestérone augmentent le nombre de sites de liaison du muscimol dans différentes régions cérébrales de rats et de hamsters ovariectomisés. De même, l'administration de valproate de sodium augmente la concentration en GABA dans l'hypothalamus et inhibe le comportement d'œstrus chez des rats femelles intacts quand l'administration est effectuée en fin de prœstrus. Toutefois, selon le site d'injection dans le cerveau, le comportement sexuel femelle peut être inhibé ou facilité. En ce qui concerne le comportement sexuel mâle, il a été montré que la concentration en GABA dans le LCR augmentait après l'éjaculation, le GABA serait donc lié à l'inhibition du comportement sexuel qui apparaît normalement après cet événement. En effet, le muscimol inhibe fortement la plupart des aspects du comportement sexuel, et la bicuculline ou la picrotoxine, injectées dans l'aire médiane préoptique, réduisent la latence d'éjaculation (dans Paredes & Ågmo, 1992).

7. Effets analgésiques du GABA

Le GABA intervient dans les mécanismes neuronaux contrôlant la douleur (Moreau & Fields, 1986 ; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Le L-baclofène, le muscimol et les inhibiteurs de la GABA-T produisent des effets analgésiques chez la souris, mais n'agissent pas sur les mêmes récepteurs GABA : le muscimol agit par l'intermédiaire de récepteurs sensibles à la bicuculline, alors que les deux autres substances impliquent des récepteurs insensibles à la bicuculline (Sawynok & LaBella, 1982). Le THIP montre des effets analgésiques très importants dans différents modèles animaux et cette analgésie est insensible au naloxone, ce qui indique qu'elle n'est pas modulée par les récepteurs opiacés. Etonnamment, l'analgésie induite par le THIP, comme dans le cas du L-baclofène (Sawynok, 1986), ne peut pas être éliminée par la bicuculline, ce qui pourrait refléter l'intervention d'une classe de récepteurs GABA distincte, les récepteurs $GABA_X$ (Figure 9 ; dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Par contre, Kendall *et al.* (1982 dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a) ont montré qu'elle pouvait être réduite par l'atropine et potentialisée par des substances cholinergiques, et ont proposé l'existence d'interactions entre les neurones GABA, les neurones cholinergiques et les systèmes opiacés centraux. Des études plus récentes n'ont pas réussi à reproduire l'antagonisme par l'atropine de l'analgésie induite par le THIP dans plusieurs modèles animaux mais ont mis en évidence une sensibilité à un agoniste sérotonergique (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Il

existerait donc une interaction entre les systèmes centraux GABAergiques et sérotonergiques. L'analgésie induite par des substances GABAergiques serait modulée, non pas par des récepteurs GABA spinaux comme le suggéraient les premières expérimentations, mais plutôt par des mécanismes GABAergiques dans le cerveau antérieur et le mésencéphale (Moreau & Fields, 1986). Le THIP est un analgésique approximativement aussi efficace que la morphine, mais leurs efficacités relatives dépendent de l'espèce animale et du test utilisés. Des études cliniques sur des patients ayant des douleurs chroniques d'origine maligne ont révélé de puissants effets analgésiques du THIP. Mais, chez ces patients cancéreux ainsi que chez des patients anxieux chroniques, les effets analgésiques du THIP s'accompagnent d'effets secondaires légers, notamment de sédation, de nausées et, dans quelques cas, d'euphorie. Dans une certaine mesure, ces effets indésirables pourraient être imputables à la mauvaise pharmacocinétique du THIP qui nécessite d'être améliorée. L'insensibilité au naloxone et le manque apparent de dépendance liée à l'analgésie modulée par le GABA suggèrent que les substances GABAergiques pourraient bientôt jouer un rôle dans le traitement de la douleur et de la toxicomanie opioïde (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

8. Effets du GABA sur l'activité motrice et exploratrice

Parmi tous les comportements affectés par le GABA, les fonctions motrices sont certainement les plus étudiées. L'un des effets majeurs d'une administration systémique d'agents GABAergiques est l'hypomotilité que l'on appelle très souvent sédation. Cet effet n'est pas particulier au GABA. En employant une dose suffisamment élevée, on pourra obtenir des effets moteurs avec presque tous les médicaments. Toutefois, les effets moteurs doivent être pris en compte dans toute analyse des effets comportementaux du GABA.

Wachtel & Andén (1978) ont effectué des injections bilatérales de GABA dans le *nucleus accumbens* : les rats témoins ayant reçu une injection bilatérale de NaCl dans le *nucleus accumbens* avaient une activité assez élevée pendant les 10 premières mn, puis ils montraient une diminution rapide de l'activité, et ils atteignaient un niveau à peu près stable au bout d'une h ; Par contre, les rats ayant reçu des doses élevées de GABA (2 x 250 µg) présentaient une diminution de l'activité motrice pendant les 10 premières mn et cette hypoactivité n'était pas suivie d'une hyperactivité (Wachtel & Andén, 1978). En injectant du GABA dans le système nigrostriatal ou mésolimbique, Koella (1981) a également observé des effets sédatifs, se manifestant par une diminution de l'activité locomotrice.

A l'inverse, des réductions très importantes de l'activité GABAergique cérébrale sont susceptibles d'induire une activité motrice excessivement élevée et

incoordonnée et, dans le cas extrême, des crises épileptiques. Koella (1981) a effectué des injections d'antagonistes du GABA (bicuculline, picrotoxine) dans la *substantia nigra* et a montré des effets différents en fonction des doses administrées : à des dosages inférieurs à 15 µg, il a observé une augmentation de l'activité locomotrice et des reniflements ; à des doses allant de 15 à 500 µg, il a observé des comportements stéréotypés (morsure, claquement de dents et mastication) ; enfin, des doses très élevées provoquaient des crises épileptiques. Tomaz *et al.* (1988) ont montré que, chez des rats ayant subi une ablation du télencéphale, des micro-injections unilatérales dans la matière grise dorsale périaqueducale, d'antagonistes du GABA, comme la bicuculline, induisaient une activation comportementale (augmentation de la locomotion et du nombre de redressements, rotations et dans certains cas, sauts). Dans l'hypothalamus médian, de telles injections provoquaient également une très nette activation comportementale se manifestant par des comportements tels que la course, les sauts et les redressements (Tomaz *et al.*, 1988). Koella (1981) a suggéré que le GABA était impliqué dans l'organisation du repos et de la passivité. En effet, il a observé des différences de concentration en GABA dans le SNC au cours de la journée, la concentration maximale correspondant au niveau maximum d'activité locomotrice.

Ågmo & Giordano (1985) ont précisé le type de récepteur GABA impliqué dans le contrôle de l'activité locomotrice en utilisant des agonistes $GABA_A$ (3-APS et THIP) et $GABA_B$ (baclofène). Ils ont ainsi montré que la diminution d'activité locomotrice, induite par les substances GABAergiques, ne dépendait pas des récepteurs $GABA_A$, mais des récepteurs $GABA_B$. En effet, le baclofène était la plus efficace des trois substances testées pour diminuer l'activité locomotrice, et provoquait même une immobilité presque complète, alors que le 3-APS n'affectait pas l'activité locomotrice et que le THIP produisait un effet intermédiaire insensible à la bicuculline.

9. Effets du GABA sur l'équilibration

En inhibant la dégradation du GABA avec l'AOAA, on observe une augmentation du taux de GABA dans le cortex moteur et le cervelet qui porte atteinte à l'exécution harmonieuse des actes de locomotion appris, en particulier quand l'équilibre et la coordination des pattes postérieures sont nécessaires (Koella, 1981).

10. Effets du GABA sur le tonus musculaire

En injectant par i.p. un agoniste du GABA, le GHBA, à une dose de 1,5 g/kg, on produit une anesthésie complète avec une respiration lente et un tonus musculaire réduit.

11. Effets du GABA sur la mémoire et l'apprentissage

Il semblerait que le GABA intervienne également dans l'apprentissage. Toutefois, des résultats contradictoires ont été obtenus. En effet, une injection intraventriculaire de GABA tout de suite après la fin d'une phase d'entraînement, augmente le nombre de réponses correctes dans les comportements de discrimination, mais n'a aucun effet quand l'injection est retardée de 60 mn (Koella, 1981). Nabeshima *et al.* (1988 dans Paredes & Ågmo, 1992) montrent que la picrotoxine et la bicuculline, administrées après l'entraînement, produisent un effet amnésique dans des tests d'évitement passif. Par contre, d'autres auteurs ont montré que la picrotoxine et la bicuculline, administrées après l'entraînement, augmentaient la mémorisation dans l'évitement passif, l'évitement actif et l'apprentissage d'un labyrinthe (dans Paredes & Ågmo, 1992). En fait, ces études sont difficiles à comparer car les procédures, les espèces et les modes d'administration utilisés sont variables.

12. Effets anxiolytiques du GABA

En ce qui concerne l'anxiété, du point de vue biochimique et neurophysiologique, on ne conteste plus le rôle clé du complexe récepteur $GABA_A$ dans les effets pharmacologiques des agonistes et agonistes inverses du récepteur BZD (Biggio & Costa, 1986). Si on augmente le fonctionnement du récepteur $GABA_A$, on obtient le profil d'activité caractéristique des agonistes du récepteur BZD, c'est-à-dire effets anxiolytique, anticonvulsivant, sédatif et myorelaxant (dans Haefely, 1988). Le profil comportemental des agonistes inverses du récepteur BZD, qui inhibent le fonctionnement du récepteur $GABA_A$, est diamétralement opposé à celui-ci, c'est-à-dire effets anxiogène, convulsivant, stimulant et augmentation du tonus musculaire. Par conséquent, il était logique de rechercher les éventuels effets anxiolytiques des ligands des récepteurs GABA. En fait, sur le plan comportemental, les résultats sont contradictoires et il ne semble pas toujours évident que le GABA soit impliqué dans les mécanismes de l'anxiété. Il semblerait que tous les effets des BZD ne soient pas liés à la neurotransmission GABAergique et que les substances GABAergiques puissent avoir des effets différents des BZD. En effet, le récepteur $GABA_B$ n'est pas associé à un site BZD et, seuls les récepteurs $GABA_A$ à faible affinité seraient associés aux BZD (dans Paredes & Ågmo, 1992). Ainsi, au moins deux sous-populations de récepteurs GABA seraient indépendantes des BZD, les récepteurs $GABA_B$ et les récepteurs $GABA_A$ à haute affinité. En ce qui concerne les récepteurs $GABA_C$ et $GABA_X$, jusqu'à présent, aucune association avec les récepteurs BZD n'a été montrée. Ces données biochimiques montrent que le GABA pourrait être impliqué dans un grand nombre de comportements insensibles aux BZD. De même, il existe des récepteurs BZD indépendants des récepteurs GABA (Johnston, 1986) offrant une base

structurale pour des effets des BZD ne dépendant pas du GABA. Les concentrations en BZD nécessaires pour modifier la liaison du GABA sont très supérieures à celles observées à des doses de BZD efficaces en thérapeutique (dans Paredes & Ågmo, 1992). Certains auteurs ont donc suggéré que les effets des BZD sur les fonctions motrices et sur l'activité locomotrice, ainsi que leurs effets anticonvulsivants, dépendraient du GABA, mais que tel ne serait pas le cas pour les effets anxiolytiques (Sanger, 1985 ; Shephard, 1987 ; Paredes & Ågmo, 1992).

Toutefois, plusieurs expériences montrent que les effets comportementaux des BZD peuvent être antagonisés par des antagonistes GABA comme la bicuculline ou la picrotoxine (dans Sanger, 1985) et que certains agonistes GABA reproduisent les effets des BZD. Le muscimol, par exemple, est dépourvu d'activité anxiolytique lorsqu'il est injecté par voie systémique mais lorsqu'il est administré directement dans le cerveau, il augmente les taux de réponses punies dans les tests de conflit et augmente la prise de nourriture. L'absence d'effet après administration systémique pourrait être due à une faible pénétration du muscimol dans le SNC. Toutefois, le progabide, un autre agoniste GABA qui lui, traverse facilement la BHE, ne produit généralement pas d'effet anxiolytique. Gray *et al.* (1984) ont tenté de vérifier l'hypothèse GABAergique de l'activité des agents anxiolytiques, en utilisant des agonistes $GABA_A$ et des agonistes $GABA_B$ dans des procédures faisant intervenir soit une punition, soit une non récompense, soit la nouveauté. De nombreuses contradictions apparaissaient dans l'ensemble de leurs résultats mais dans l'ensemble, ils renforçaient cette hypothèse. A l'aide d'un test de réponse à un changement de stimulus dans un labyrinthe en T, par exemple, ils ont montré que le CDP abolissait la tendance des rats à entrer de préférence dans le bras inconnu et que l'effet du CDP pouvait être mimé par le muscimol. Les effets du CDP et du muscimol étaient bloqués par la picrotoxine.

Chez l'homme, de faibles doses de muscimol calment et endorment les patients schizophrènes (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Chez des patients souffrant d'anxiété chronique, le THIP montre des effets anxiolytiques mais ils s'accompagnent d'effets secondaires (Hoehn-Saric, 1983). Le progabide montre également des effets anxiolytiques chez l'homme, mais ils sont moins importants que ceux des BZD (dans Shephard, 1987).

Des rats assoiffés, ayant reçu une injection i.v. de GABA associé à un SLC (SLC14), montrent, dans un test de conflit boisson/choc électrique, une augmentation significative du nombre de coups de langue par rapport au lot contrôle, mais cet effet n'est pas dose-dépendant (Anderson *et al.*, 1987b). Les auteurs ont vérifié qu'il ne s'agissait pas d'un effet analgésique au niveau central ou périphérique par des tests appropriés et qu'il s'agissait bien d'un effet du GABA au niveau cérébral. Par ailleurs, des rats stressés soit par une procédure de handling, soit par des chocs électriques, présentent une diminution du nombre de récepteurs GABA à faible affinité dans le

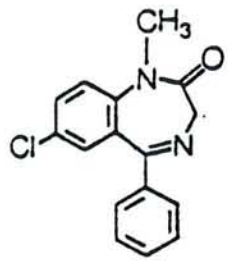
cortex cérébral, par rapport aux rats non stressés (dans Paredes & Ågmo, 1992). Par contre, le nombre de récepteurs GABA à haute affinité n'est pas modifié. Le handling ou les chocs électriques produiraient donc une diminution immédiate des récepteurs GABA et cette diminution pourrait être l'événement neurochimique majeur dans la physiopathologie de l'anxiété (Biggio & Costa, 1986).

L'hypothèse GABAergique de l'activité anxiolytique des BZD ne peut donc pas être écartée et l'amélioration des méthodes de distribution cérébrale permettra peut-être d'élucider la complexité des relations entre GABA et anxiété.

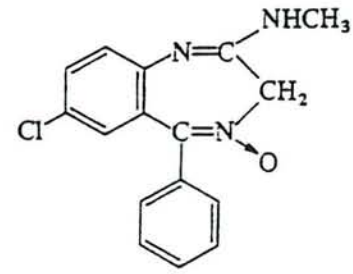
La grande diversité des effets comportementaux du GABA montre l'intérêt de mieux connaître les différents mécanismes associés à la neurotransmission GABAergique dans le SNC, afin de diriger des substances GABAergiques vers ces différents mécanismes et de développer des médicaments ayant des profils pharmacologiques et thérapeutiques plus spécifiques. Enfin, le grand nombre de résultats contradictoires nécessite la mise au point de méthodes de distribution cérébrale des agents GABAergiques.

G. Interactions GABA-BZD

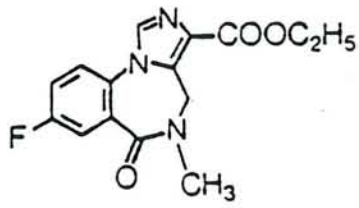
Certains sites de reconnaissance des BZD sont liés du point de vue fonctionnel à des récepteurs GABA. L'activation *in vivo* (Ferrero *et al.*, 1984) et *in vitro* (dans Corda *et al.*, 1986) des récepteurs BZD induit une augmentation de la densité des récepteurs GABA à faible affinité qui, à son tour, induit une facilitation de la transmission GABAergique. Il existe au moins deux sous-catégories de récepteurs BZD (type I et type II) dans le cerveau de mammifère (dans Braestrup & Nielsen, 1981). Ces différentes sous-catégories de récepteurs BZD pourraient moduler des effets pharmacologiques différents (anxiolytique, myorelaxant, anticonvulsivant, hypnotique et sédatif), mais cette hypothèse est toujours discutée (Martin, 1987). Le CL 218872, une triazolopyridazine qui a une affinité préférentielle pour le récepteur BZD de type I, possède les propriétés anxiolytique et anticonvulsivante des BZD, mais pas d'activité sédative (Lippa *et al.*, 1982). Ce composé augmente la liaison du [^{3}H]GABA dans des préparations membranaires de cerveau de rat. Récemment, le quazépam et ses dérivés contenant un groupement N-trifluoroéthyle ont été présentés comme les premiers dérivés des BZD, sélectifs des récepteurs de type I (dans Corda *et al.*, 1986). Mais cette conclusion est basée surtout sur des observations *in vitro*, montrant que leur affinité pour le site de type I varie d'une région cérébrale à l'autre (dans Corda *et al.*, 1986). Le quazépam produit une augmentation dose-dépendante de la densité des récepteurs GABA à faible affinité dans des préparations membranaires de cortex cérébral de rat. Cette augmentation est totalement bloquée par le Ro15-1788, un antagoniste sélectif des sites BZD centraux



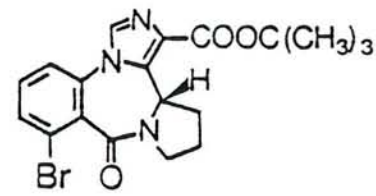
DZP
(Valium®)



CDP
(Librium®)



FLUMAZENIL
(Ro 15-1788)



Ro 16-6028

Figure 16: Formule chimique de deux agonistes (DZP et CDP), d'un antagoniste (Flumazénil) et d'un agoniste partiel (Ro 16-6028) du récepteur BZD.

(Corda *et al.*, 1986). Ainsi, les auteurs ont proposé que ces composés augmentaient la transmission GABAergique en agissant sur des sites de liaison des BZD liés du point de vue fonctionnel aux récepteurs GABA à faible affinité. Le quazépam est un agent hypnotique efficace et a des effets ataxiques légers, comparés à d'autres BZD (dans Corda *et al.*, 1986). Mais on ne peut pas conclure que seuls les récepteurs BZD de type I sont responsables de l'augmentation de la densité des récepteurs GABA à faible affinité par le quazépam, car aux doses qui augmentent la densité des récepteurs, il se fixe autant aux récepteurs BZD de type I qu'aux récepteurs de type II (Corda *et al.*, 1986). Comme on ne dispose pas actuellement d'agonistes et d'antagonistes spécifiques des deux types de récepteurs BZD, on ne sait pas encore quel type de récepteur est impliqué dans l'augmentation de la densité des récepteurs GABA.

II. LES BENZODIAZEPINES (BZD)

A. Historique

Les BZD ont été introduites en clinique en 1960. Le chlordiazépoxide (CDP) ou Librium® (Figure 16) était alors utilisé en clinique comme hypnotique, anxiolytique, anticonvulsivant et myorelaxant. Depuis, les BZD font partie des médicaments les plus fréquemment prescrits. Leur popularité est liée au fait qu'elles possèdent un index thérapeutique large, qu'elles sont moins dangereuses en cas d'overdose que les barbituriques, qui étaient les meilleurs anxiolytiques auparavant, et qu'elles sont dépourvues d'effets secondaires périphériques. Par la suite, une dépendance et des phénomènes de manque à l'arrêt du traitement ont été observés chez les patients traités avec ces composés pendant de longues périodes. C'est pourquoi, en 1980, le Royaume Uni a donné des recommandations pour une utilisation restreinte des BZD. Le deuxième composé introduit en 1963, qui a obtenu encore plus de succès que le CDP, est le diazépam (DZP) ou Valium® (Figure 16).

Le profil pharmacologique des BZD est relativement large, puisqu'il englobe des propriétés anxiolytiques, anticonvulsivantes, sédatives (effet tranquillisant, amélioration du sommeil et réduction de la vigilance) et myorelaxantes (résumé dans Tableau 8). Mais ce profil d'activité est également relativement spécifique, puisqu'il se distingue clairement de celui des autres substances affectant le fonctionnement du SNC. Dans le groupe des BZD, les profils pharmacodynamiques des différents composés disponibles en clinique, sont très peu différents. Par contre, leurs pharmacocinétiques sont très variables (Tableau 9) : les demi-vies biologiques vont de 2.5 h pour le triazolam à 100 h pour le N-desméthyl-DZP (dans Martin, 1987). Ce sont surtout ces différences qui orientent la prescription du composé approprié.

Effets pharmacologiques	Indications thérapeutiques
Activité anticonflictuelle, antipunition, antifrustration et désinhibition comporte-mentale	Anxiété, phobies, dépression anxieuse, inhibition comportementale pathologique
Effet anticonvulsivant	Différentes formes d'activité épileptique (épilepsies, intoxications par des convulsivants)
Réduction de l'éveil, de la vigilance, effet antistress, facilitation du sommeil	Etats hyperémotionnels, schizophrénie, insomnie
Atténuation des réponses endocrines et du système nerveux autonome aux émotions et à un excès de stimuli afférents	Désordres psychosomatiques (hormonal, cardiovasculaire, gastro-intestinal, urogénital)
Relaxation musculaire centrale	spasmes musculaires somatiques et psychogènes, tetanie
Potentialisation de l'activité des antidépresseurs, amnésie antérograde	Anesthésie équilibrée pour interventions chirurgicales
Absence essentielle d'effets hors du SNC; toxicité extraordinairement faible	

Tableau 8: Principaux effets pharmacologiques et indications thérapeutiques des BZD (d'après Haefely, 1988).

BZD	métabolites actifs	T_{max} (h) moyenne (gamme)	$T_{1/2}$ (h) moyenne (gamme)	Commentaires
Diazépam (DZP)		1 (0.5-1.5)	46 (20-70)	$T_{1/2}$ augmente avec l'âge, la cirrhose et la cimétidine
	Desméthyl-DZP	35 (24-48)	62 (51-120)	
	Oxazépam		7.6 (6-25)	
Chlordiazépoxide (CDP)		1.5 (1-2)	10 (5-30)	$T_{1/2}$ augmente avec la cirrhose hépatique et la cimétidine
	N-desméthyl-CDP	9 (8-14)		
	N-desméthyl-DZP		62 (51-120)	
Triazolam		1.7 (0.5-6)	3 (1-4.5)	T_{max} raccourci chez femelles âgées; clearance réduite avec âge et par cimétidine
Flumazénil (Ro 15-1788)		0.75 (0.3-1.5)	1 (0.7-1.3)	Biodisponibilité orale: 10% seulement

Tableau 9: Données pharmacocinétiques pour quelques-unes des BZD les plus utilisées (d'après Feely & Pullar, 1990).

B. Mécanisme d'action des BZD

Les effets du DZP dépendent de l'intégrité fonctionnelle du système GABA (dans Martin, 1987). Il a été montré que les BZD se liaient aux membranes neuronales à des endroits souvent liés à un récepteur GABA post-synaptique (Gavish & Snyder, 1981 ; Möhler *et al.*, 1981a,b ; Unnerstall *et al.*, 1981) et facilitaient, non seulement l'inhibition pré-synaptique dans différentes régions du SNC de mammifère, mais également l'inhibition post-synaptique GABAergique (Costa *et al.*, 1976 ; Haefely *et al.*, 1975), ce qui suggérait que la synapse GABA était probablement le site d'action primaire des BZD. Le mécanisme de cette facilitation est une augmentation, par les BZD, de la réponse au niveau des récepteurs $GABA_A$ post-synaptiques à la suite d'un stimulus GABA. Les BZD se fixent sur un site spécifique des BZD qui fait partie du complexe récepteur $GABA_A$ et augmentent la fréquence d'ouverture du canal Cl^- en réponse à un stimulus GABA donné. Cet effet est très différent de celui des barbituriques qui affectent surtout la durée de vie du canal (dans Martin, 1987).

C. Les récepteurs BZD

Les premières expériences de liaison de radioligands ont montré que des membranes de cerveau de rat étaient capables de lier du [^{3}H]DZP d'une manière saturable et spécifique avec une haute affinité (Möhler & Okada, 1977 ; Squires & Braestrup, 1977). Le site de liaison fait partie intégrante du récepteur pharmacologique par l'intermédiaire duquel ces composés produisaient leur effet. Les récepteurs BZD ne constituent cependant pas une population homogène puisqu'on observe une inactivation diphasique ou polyphasique (dans Squires, 1983). Un premier modèle a été établi qui distinguait deux catégories de récepteurs BZD : les récepteurs BZD de type I et II. Les récepteurs BZD de type I seraient présents dans tout le cerveau et surtout dans le cervelet, alors que les récepteurs de type II seraient abondants dans le cortex, l'hippocampe et la moëlle épinière. Plus tard, les travaux de biologie moléculaire ont grandement allongé la liste des types de récepteurs mais les conséquences fonctionnelles de cette hétérogénéité restent encore peu comprises (Doble & Martin, 1992). La distribution des sites de liaison des BZD est pratiquement identique à celle des récepteurs $GABA_A$ visualisés par la liaison de muscimol radioactif (Haefely, 1987). Ces sites sont localisés sur la membrane cellulaire du neurone (dans Martin, 1987). Des sites de liaison du DZP ont été trouvés également sur des cellules non neuronales, à la fois dans le SNC (cellules gliales et autres) et hors du SNC, mais les caractéristiques de ces sites sont très différentes de celles des sites centraux. On ne connaît pas encore exactement le rôle de ces sites dits périphériques, et il semblerait qu'il ne s'agisse pas de récepteurs pharmacologiques, contrairement aux récepteurs centraux.

PROPRIETE	AGONISTES	ANTAGONISTES	AGONISTES INVERSES
Profil pharmacologique	Tranquillisant, anticonvulsivant	pas d'activité intrinsèque; bloque les effets des agonistes et des agonistes inverses	anxiogène, convulsivant, stimulant
Effet sur le GABA	potentialisation	aucun effet; bloque les effets des agonistes et des agonistes inverses	dépression
Liaison en présence de GABA	↑	pas affectée	↓

Tableau 10: Classification des ligands du récepteur BZD (d'après Haefely, 1988).

D. Interactions au niveau du complexe récepteur GABA-BZD

Le DZP augmente la liaison à faible affinité du GABA sur son site (Skerritt *et al.*, 1982). La présence de concentrations élevées de GABA *in vitro*, augmente fortement l'affinité des agonistes BZD pour leurs sites de liaison (Tallman *et al.*, 1980). Par contre, les antagonistes BZD ne montrent pas de changement d'affinité en présence de GABA, et les agonistes inverses montrent une diminution de l'affinité pour leur site de liaison dans les mêmes conditions (Braestrup *et al.*, 1982). Le complexe récepteur $GABA_A$-BZD possède donc un certain nombre de sites de liaison accessoires qui interagissent, d'une manière allostérique réciproque très compliquée, pour modifier l'ouverture du canal chlorure (Figures 3-4). L'occupation du site de liaison du GABA par une molécule de GABA, ou un agoniste GABA, induit des changements conformationnels qui aboutissent à l'ouverture du canal Cl^-. Les ligands du récepteur BZD peuvent moduler, d'une manière allostérique, l'affinité du site GABA pour son ligand, et ainsi, affecter la transition de l'état fermé du canal vers l'état ouvert.

Le récepteur BZD n'est pas le récepteur primaire du complexe récepteur $GABA_A$, c'est-à-dire qu'il ne contrôle pas directement l'ouverture du canal Cl^-. En fait, le récepteur $GABA_A$ est le récepteur primaire dans le complexe, et le récepteur BZD en est le récepteur secondaire. Ce récepteur secondaire module le réglage fin ou l'augmentation de l'ouverture du canal Cl^- produite par le récepteur $GABA_A$ (Figure 3). Les ligands du récepteur BZD se différencient par leur efficacité intrinsèque, en d'autres termes par le changement conformationnel qu'ils provoquent au niveau du récepteur BZD. Les ligands du récepteur BZD sont classés en :

- **agonistes** (ou modulateurs allostériques positifs) ayant une efficacité intrinsèque positive ;
- **agonistes inverses** (ou modulateurs allostériques positifs) ayant une efficacité intrinsèque négative ;
- **antagonistes** (bloquant la modulation allostérique) n'ayant pas d'efficacité intrinsèque (Tableau 10 ; Figure 17).

En plus de ces trois catégories principales, il existe des agonistes partiels et des agonistes partiels inverses (Figure 17 ; Haefely, 1987).

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer les interactions des ligands avec le récepteur BZD (Figure 18) :

- Un "**modèle à trois états**" (Polc *et al.*, 1982 dans Haefely, 1987) : il suppose que le récepteur peut exister sous trois états ayant des niveaux d'énergie différents, et qu'en l'absence de ligand sur le récepteur, celui-ci est dans une conformation qui n'affecte pas l'effet du récepteur $GABA_A$ sur l'ouverture du canal Cl^-, appelée conformation "neutre" ou "inefficace" :

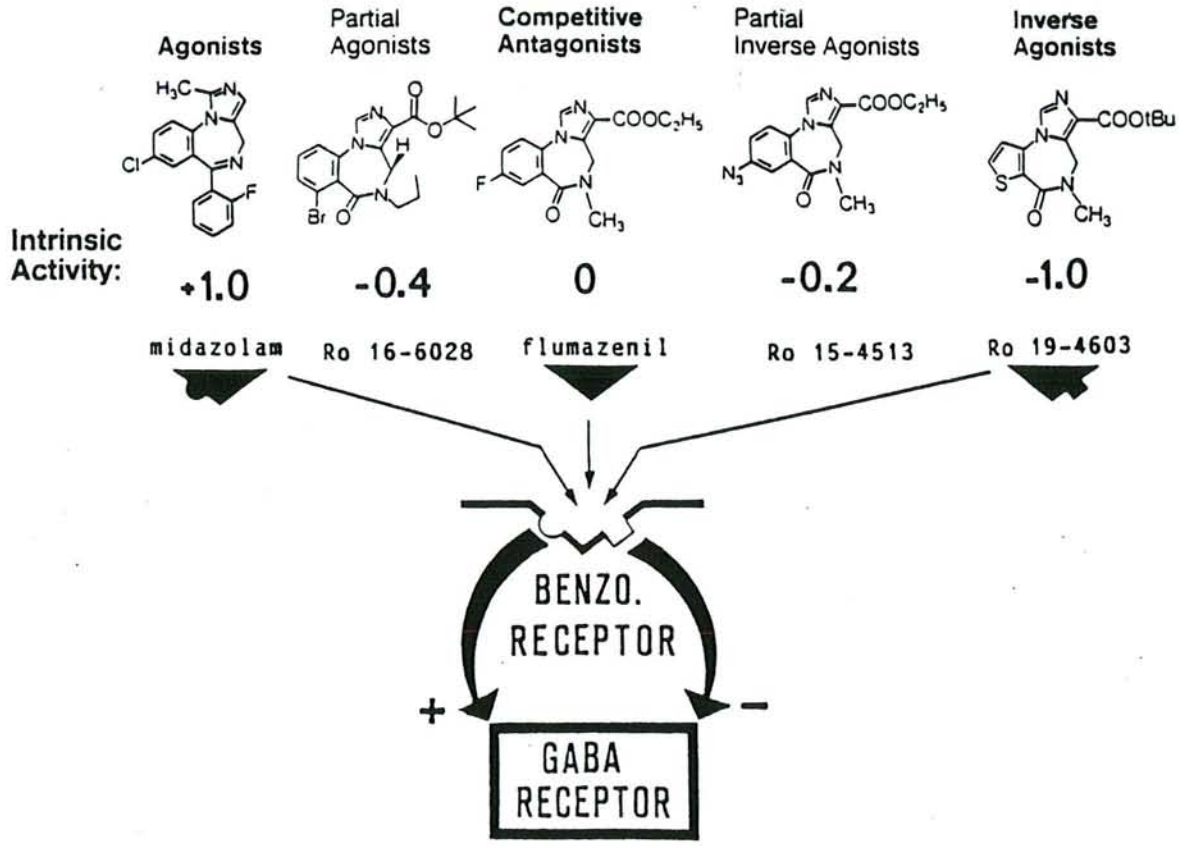


Figure 17: Représentation schématique des différentes classes de ligands du récepteur BZD (dans Haefely, 1987).

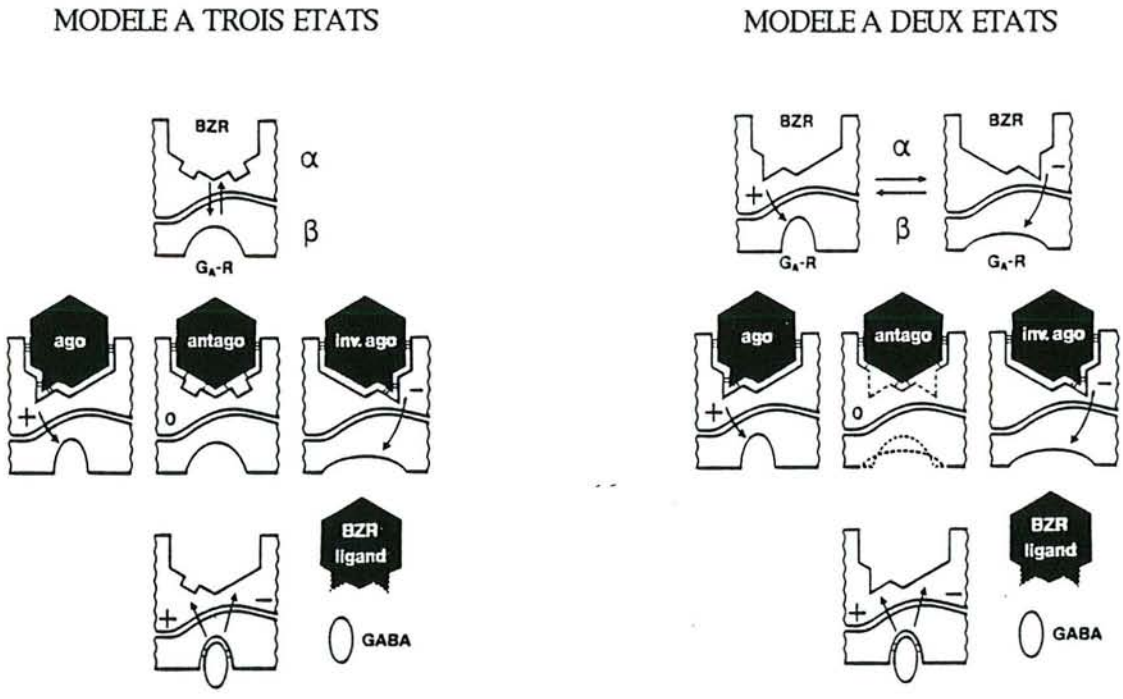


Figure 18: Représentation schématique de l'interaction des agonistes, antagonistes et agonistes partiels avec le récepteur BZD, suivant le modèle à deux ou trois états. Ne sont présentées que des petites parties des sous-unités α et β portant le récepteur BZD (BZR), le récepteur $GABA_A$ (G_A-R) et l'interphase entre les deux (dans Haefely, 1987).

* Les antagonistes se lieraient au récepteur BZD sans changer sa conformation (c'est-à-dire conformation "neutre" ou "inefficace"). Mais, par leur présence sur le récepteur, ils empêcheraient les agonistes et les agonistes inverses de se fixer ;
* Les agonistes induiraient un changement de conformation, qui aurait une influence modulatrice allostérique positive sur le récepteur $GABA_A$;
* Les agonistes inverses induiraient une autre conformation ayant une influence modulatrice allostérique négative.

- Un "**modèle à deux états**" (Braestrup *et al.*, 1983 dans Haefely, 1987) : il suppose qu'en l'absence de ligand sur le récepteur, celui-ci oscille spontanément entre deux états conformationnels interconvertibles, l'un correspondant à l'état modulateur positif, et l'autre correspondant à l'état modulateur négatif. L'équilibre entre ces deux états définirait le "niveau d'efficacité de repos" du fonctionnement du récepteur $GABA_A$:
  * Les antagonistes se lieraient, de façon équivalente aux deux conformations, ne modifiant ni l'équilibre, ni l'efficacité du fonctionnement du récepteur $GABA_A$;
  * Les agonistes se lieraient préférentiellement à la conformation "positive", la stabiliseraient et ainsi, déplaceraient l'équilibre vers la conformation modulatrice positive, ce qui conduirait à une augmentation de l'efficacité ;
  * Les agonistes inverses se lieraient préférentiellement à la conformation "négative", et par conséquent, réduiraient l'efficacité.

L'aspect intéressant de cette hypothèse est qu'elle permettrait de définir précisément l'efficacité intrinsèque, par le rapport des affinités pour les conformations "positive" et "négative". Apparemment, à ce jour, rien ne permet de rejeter l'un ou l'autre de ces deux modèles.

E. Les ligands du récepteur BZD

1. Agonistes du récepteur BZD

Les BZD classiques, de type 1,4-BZD, augmentent la transmission GABAergique et les effets du GABA exogène provoqués via les récepteurs $GABA_A$. En fait, les agonistes BZD augmentent l'affinité apparente du récepteur $GABA_A$ pour le GABA. Les 1,4-BZD sont des agonistes complets et produisent la gamme complète des effets pharmacologiques des BZD : ils ont des effets hypnotique, anxiolytique, anticonvulsivant et myorelaxant. De faibles doses d'un tel composé produisent un effet anticonvulsivant important. En augmentant progressivement les doses, des effets anticonflictuels apparaissent, et en augmentant encore les doses, on observe les effets myorelaxants. Des mesures du degré d'occupation des récepteurs ont montré

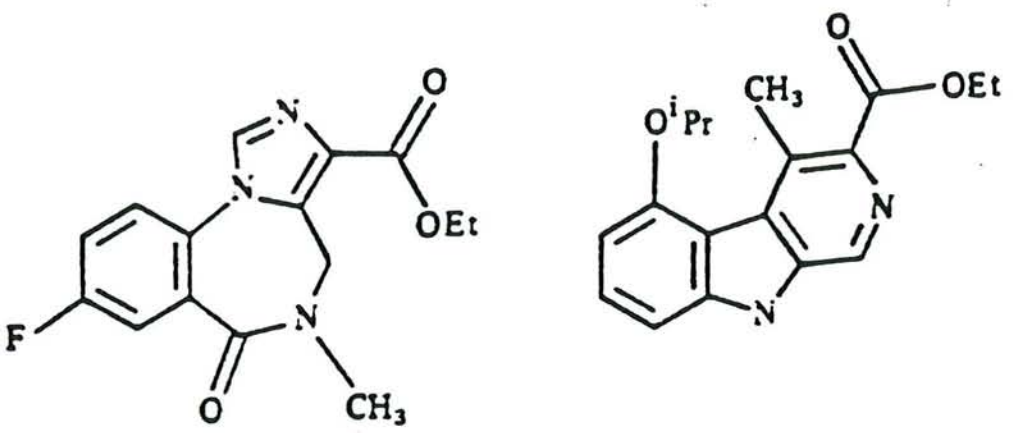


Figure 19: Structure du Ro15-1788 (**a**) et du ZK93426 (**b**) (dans Martin, 1987).

que, pour un agoniste complet du récepteur BZD, l'ED_{50} requise pour inhiber les convulsions induites par le PTZ, correspond à l'occupation de 20 à 25% des sites BZD, alors que les effets anticonflits apparaissent quand 60% des sites BZD sont occupés (dans Martin, 1987). Ainsi, les agonistes partiels, même à très forte dose, ne produiront pas des effets tels que la relaxation musculaire, qui seront observés uniquement avec une occupation très élevée des sites par les agonistes complets.

2. Agonistes inverses du récepteur BZD

Ces composés ont une haute affinité pour le récepteur BZD, mais produisent des effets exactement inverses des effets bien connus des agonistes BZD : effets anxiogènes, proconvulsivants et convulsivants, augmentation de la vigilance et du tonus musculaire (Braestrup *et al.*, 1980). Ces ligands réduisent la liaison du GABA et réciproquement, le GABA réduit leur liaison. Ils diminuent l'ouverture du canal Cl^- et ainsi, la transmission synaptique GABAergique.

3. Antagonistes du récepteur BZD

Certains dérivés des BZD, des imidazobenzodiazépines, se lient au récepteur BZD avec une haute affinité mais ne produisent aucun effet pharmacologique observable par eux-mêmes. Toutefois, ils bloquent spécifiquement les effets des agonistes et des agonistes inverses. Les antagonistes des récepteurs BZD ont peu ou pas d'effet modulateur sur le fonctionnement du récepteur $GABA_A$ et donc, n'affectent pas la transmission GABAergique. L'interaction allostérique réciproque n'existe pas non plus, c'est-à-dire que le GABA n'affecte pas la liaison des antagonistes BZD sur leur récepteur.

Le flumazénil (Figure 16), le Ro15-1788 (Figure 19a), deux imidazobenzodiazépines, et le ZK 93426, un analogue de l'acide β-carboline-3-carboxylique (Figure 19b) sont des antagonistes du récepteur BZD.

4. Agonistes partiels et agonistes inverses partiels du récepteur BZD

Parmi les milliers de ligands du récepteur BZD connus, tous ne rentrent pas dans une des trois catégories précédentes. Les ligands couvriraient plutôt un continuum d'efficacités intrinsèques entre les deux extrêmes, les agonistes complets étant à une extrémité, et les agonistes inverses complets à l'autre (Figure 17). Si on attribue une efficacité intrinsèque de +1 aux agonistes produisant l'augmentation la plus marquée de l'effet du GABA, une efficacité intrinsèque de zéro aux antagonistes ne produisant aucune modification de l'effet du GABA, et une efficacité intrinsèque de -1 aux agonistes inverses produisant un abaissement maximal, alors les agonistes

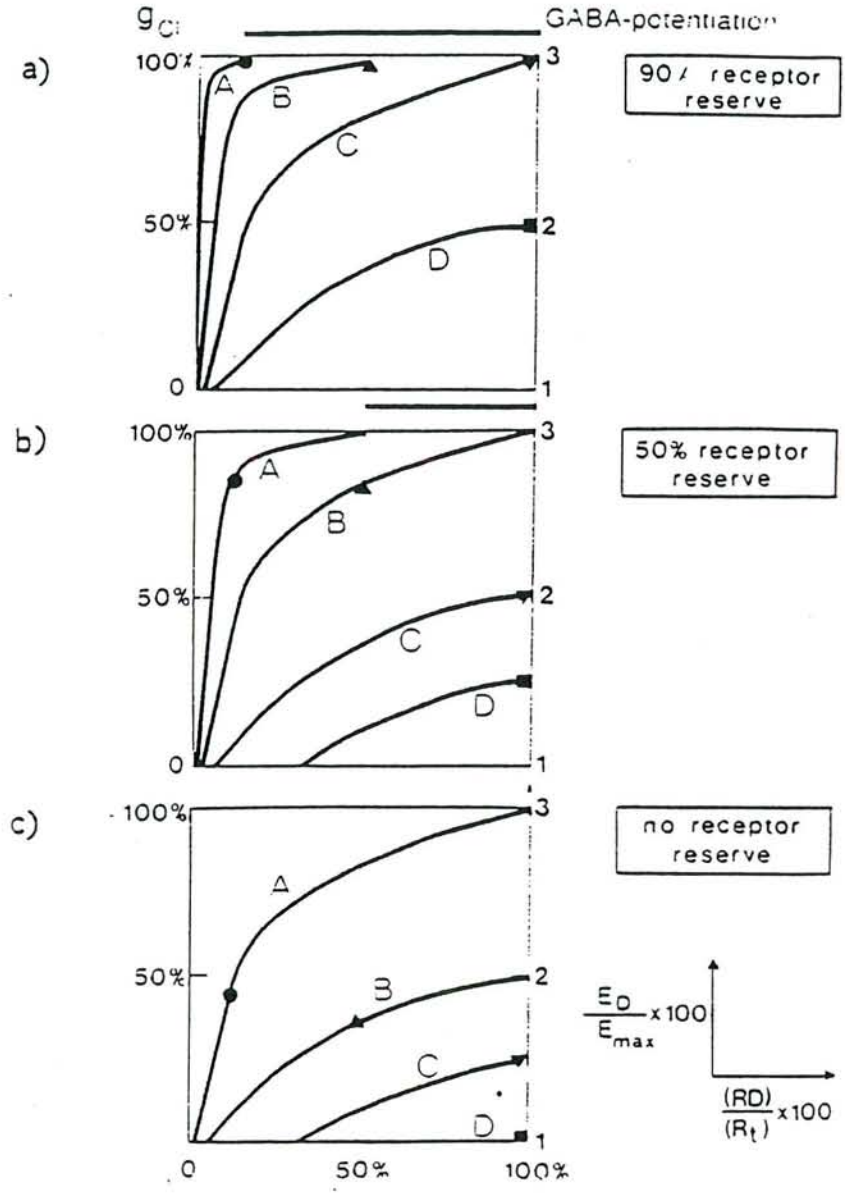


Figure 20: Relation entre le pourcentage d'occupation des récepteurs (en abscisse) et l'intensité de l'effet (en ordonnée). L'échelle de gauche indique l'intensité de la conductance aux Cl- (en % du maximum), celle de droite indique l'intensité de la potentialisation du GABA (1: aucune augmentation; 2: augmentation d'un facteur 2; 3: augmentation d'un facteur 3 du changement de conductance induit par le GABA). Les trois carrés illustrent la situation pour quatre ligands (A, B, C, D) dans trois neurones hypothétiques présentant des densités de récepteurs $GABA_A$-BZD différentes (et donc, des réserves de récepteurs différentes). A: GABA; B: agoniste complet; C et D: agonistes partiels (dans Haefely, 1987).

partiels sont des ligands ayant une efficacité intrinsèque comprise entre +1 et zéro, et les agonistes inverses partiels, ceux qui ont des valeurs comprises entre zéro et -1.

La relation entre le pourcentage d'occupation des récepteurs, que l'on peut mesurer directement par la technique des radioligands, et l'intensité de l'effet pharmacologique est présentée dans la Figure 20 (Haefely, 1987). Dans les différentes régions du SNC, les neurones n'ont pas la même densité de complexes récepteurs $GABA_A$-BZD. Supposons que le neurone de type a (Figure 20a), qui présente une densité de récepteurs élevée, fait partie du système responsable des effets anxiolytiques et anticonvulsivants des agonistes BZD. Il est probable qu'une augmentation maximale de la conductance aux ions Cl^- en réponse au GABA, soit atteinte avec un taux d'occupation faible des récepteurs $GABA_A$. A quel type de ligands du complexe récepteur GABA-BZD correspondent alors les composés A, B, C et D ?

- Le GABA se comporterait comme le composé A, c'est-à-dire qu'il resterait une grande réserve de récepteurs. Il produirait également une augmentation maximale de la conductance aux ions Cl^- dans les neurones de type b et c (Figure 20b et c), impliqués dans les effets sédatifs et myorelaxants des agonistes BZD, mais seulement avec un taux élevé d'occupation des récepteurs.
- Un agoniste BZD complet agirait comme le composé B pour potentialiser les effets du GABA, c'est-à-dire en décalant la courbe dose-réponse du GABA vers la gauche. Un décalage maximal (c'est-à-dire multiplié par trois) pourrait encore être obtenu avec cet agoniste complet dans le neurone de type b avec une occupation complète des récepteurs. Par contre, dans le neurone de type c, même avec une saturation des récepteurs, le décalage maximal ne peut plus être atteint. Cette situation explique pourquoi un agoniste complet peut produire des effets anxiolytiques et anticonvulsivants à des doses induisant peu ou pas d'effets secondaires sédatifs.
- Les agonistes partiels du récepteur BZD, comme ceux indiqués par les composés C et D (Figure 20) pourraient encore produire une potentialisation du GABA efficace du point de vue thérapeutique, dans les neurones de type a et peut-être de type b, mais plus dans les neurones de type c. En effet, les agonistes partiels auraient un effet antagoniste sur les agonistes complets dans ce dernier neurone. Par conséquent, l'agonisme partiel du récepteur BZD réduit considérablement l'efficacité pharmacologique des propriétés des BZD qui apparaissent souvent comme des effets secondaires.

L'existence d'un continuum d'efficacités intrinsèques et de réserves variables de récepteurs pour différentes fonctions du SNC explique pourquoi les antagonistes des récepteurs BZD antagonisent plus efficacement les effets sédatifs et myorelaxants des agonistes que leurs effets anxiolytiques et anticonvulsivants, puisque ces derniers nécessitent un taux d'occupation des récepteurs plus petit.

5. Ligands endogènes du récepteur BZD

La découverte d'un récepteur modulateur allostérique sur le récepteur $GABA_A$, par lequel les médicaments peuvent modifier le fonctionnement du récepteur $GABA_A$, a immédiatement posé la question de l'existence d'un composé naturel dans le SNC qui aurait une activité de modulateur endogène. Plusieurs molécules ont été proposées comme ligands endogènes du récepteur BZD. La plus étudiée est une molécule appelée DBI ("Diazepam Binding Inhibitor") qui montre des propriétés d'agoniste inverse (Guidotti *et al.*, 1984). Le DBI est présent en concentrations élevées dans le cerveau de rat, et en très faible quantité dans les organes périphériques, mais on ne sait pas encore s'il se trouve dans le compartiment extracellulaire ou intracellulaire. Du point de vue comportemental, le DBI a été étudié dans le test de Vogel : il a une activité anxiogène et bloque l'effet anticonflit du DZP (Guidotti *et al.*, 1984). On trouve également des BZD pharmacologiquement actives dans le cerveau d'humains et d'animaux (par exemple, le DZP et le *N*-méthyl-DZP), ainsi que dans des plantes utilisées dans l'alimentation comme les pommes de terre et le blé (dans Haefely, 1987).

III. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE

Chez l'Homme et la plupart des animaux, l'une des conditions nécessaires à la vie est l'homéostasie, c'est-à-dire le maintien d'un milieu interne constant. Le cerveau est certainement l'organe pour lequel cette condition est la plus cruciale. Dans le reste de l'organisme, la concentration extracellulaire en hormones, en acides aminés ou en ions varie parfois légèrement, notamment après les repas. Or, si de telles fluctuations avaient lieu dans le cerveau, l'activité nerveuse serait totalement perturbée. Pour éviter cela, l'évolution a doté les organismes complexes d'une barrière qui "isole" le cerveau. Cette barrière n'existe que chez les animaux ayant des fonctions cérébrales complexes. Du point de vue ontogénétique, la BHE n'est pas encore complètement efficace à la naissance. Chez l'Homme par exemple, on considère que la BHE est pratiquement installée seulement vers l'âge de deux ans (Bustany, 1983).

Le cerveau de mammifère est le seul, parmi tous les organes du corps, à pouvoir réguler, dans des limites très étroites, la composition de son propre environnement aqueux. Il contrôle notamment la concentration de beaucoup d'ions, de substrats métaboliques, de nutriments et de produits de déchet. Il est également capable de limiter fortement l'entrée de beaucoup de composés exogènes, en particulier des substances hydrosolubles. Ce phénomène a été attribué à la BHE dont le concept est issu des travaux d'Ehrlich qui, à la fin du XIX^{e} siècle, avait observé que l'injection intraveineuse de certains colorants, colorait tous les organes sauf le

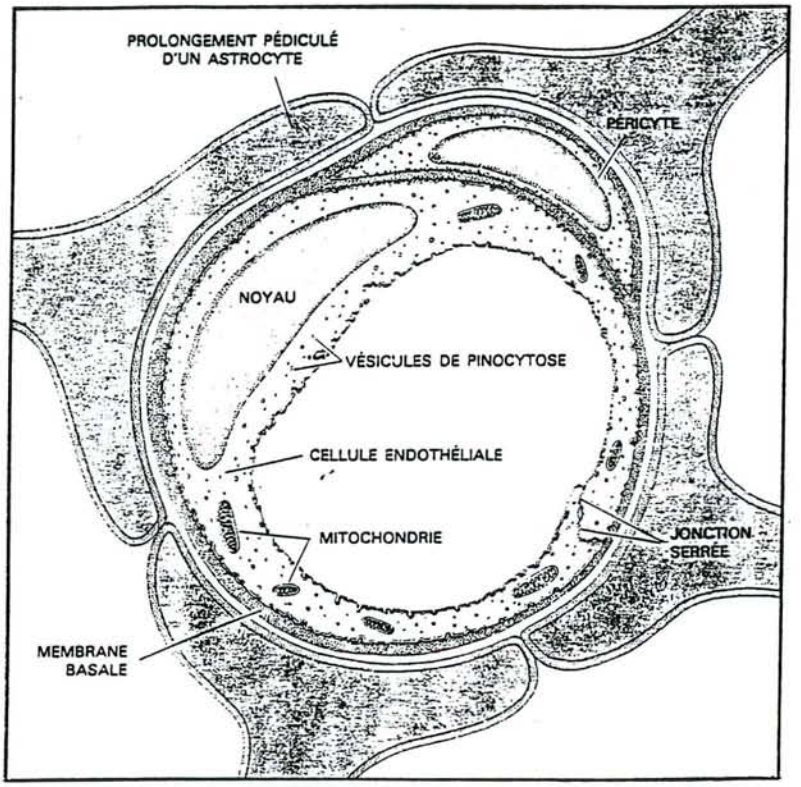


Figure 21: Coupe transversale d'un capillaire cérébral. Les prolongements pédiculés des astrocytes entourent presque complètement les capillaires cérébraux. En raison de cette relation, on pensait autrefois que les astrocytes constituaient la BHE, mais on sait aujourd'hui que ce sont au contraire, les cellules endothéliales. Celles-ci transportent de façon sélective les substances nutritives dans le cerveau, leurs nombreuses mitochondries fournissant probablement l'énergie nécessaire à ce transport (dans Goldstein & Betz, 1986).

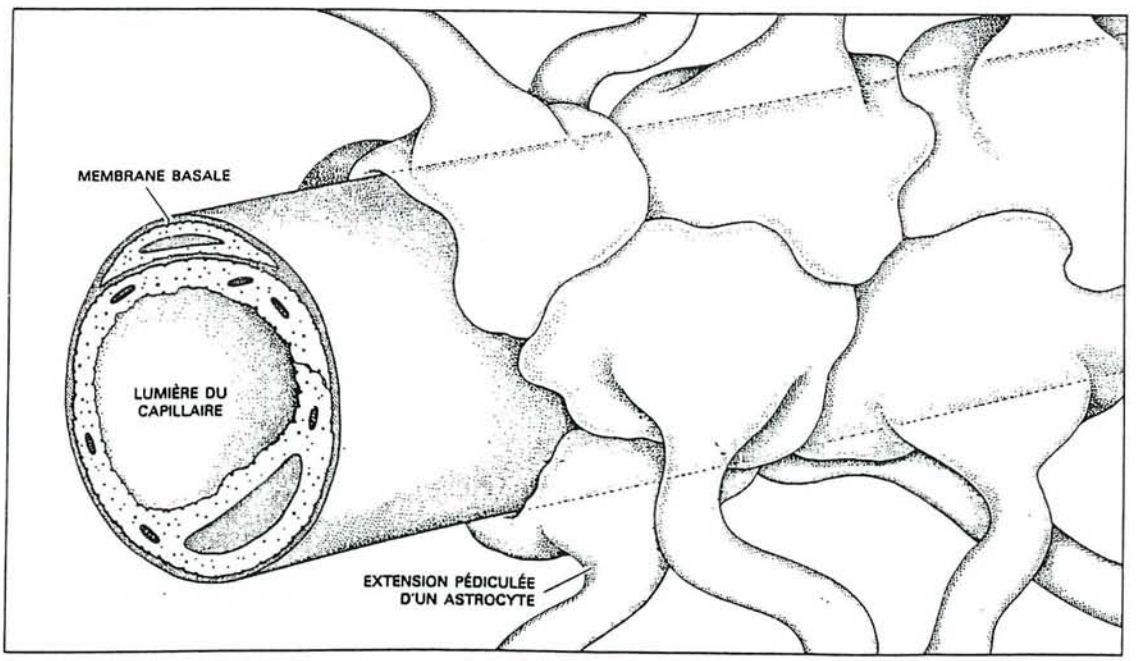


Figure 22: Capillaire cérébral. Les capillaires cérébraux sont enveloppés par des prolongements pédiculés des astrocytes formant une mosaïque. La membrane basale solidarise les cellules endothéliales et leur confère une forme tubulaire. La lumière du capillaire est souvent juste assez large pour qu'un globule rouge puisse passer. Les capillaires assurent les échanges entre le sang et les tissus (dans Goldstein & Betz, 1986).

cerveau. Il en avait conclu que le cerveau présentait une affinité pour les colorants inférieure à celle des autres tissus (dans Goldstein & Betz, 1986). En 1913, Goldmann montra que cette explication était erronée en injectant directement un colorant dans le LCR et il observa que la totalité du cerveau était colorée mais pas les autres tissus. Il avait ainsi démontré l'existence d'une barrière entre le SNC et le reste de l'organisme (dans Goldstein & Betz, 1986).

Vers les années 1950, avec l'avènement de la microscopie électronique, on localisa précisément la BHE au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, qui sont des jonctions serrées (Figures 21-22). En effet, quand un traceur de poids moléculaire élevé, la peroxydase du raifort, est injecté dans le LCR, il diffuse lentement entre les astrocytes jusqu'aux jonctions interendothéliales où il est stoppé. Et inversement, lorsque la peroxydase du raifort est injectée par voie intraveineuse, elle diffuse dans tout l'organisme, sauf dans le cerveau où elle est bloquée par ces mêmes jonctions.

La BHE est donc localisée dans les capillaires cérébraux. Toutefois, certaines régions de l'interface sang-cerveau ont des propriétés de perméabilité différentes : les villosités arachnoïdiennes et l'épithélium des plexus choroïdes (Rapaport, 1976 dans Reed, 1980 ; Figure 23). De plus, la BHE est interrompue en plusieurs endroits. C'est l'ensemble de ces sites sans BHE que l'on appelle les organes circumventriculaires : il s'agit de l'hypophyse, de l'épiphyse et de certaines régions de l'hypothalamus. Dans ces organes, les jonctions entre les cellules endothéliales ne sont pas de type serré et les cellules contiennent de nombreuses vésicules. Il apparaît que l'absence de barrière, dans ces parties du cerveau, permet aux hormones circulantes d'atteindre les neurones sécrétoires dans le cerveau qui referment ainsi les boucles de rétroaction des systèmes neuro-endocriniens. Mais, ces structures ont un volume faible par rapport à tout le SNC et la surface d'échange est faible (1/5000) par rapport à la surface totale de l'interface sang-cerveau (Pardridge, 1991).

A. Barrière morphologique

La BHE sépare le compartiment sanguin du parenchyme cérébral et maintient l'homéostasie ionique du milieu interstitiel baignant les synapses. Les composantes anatomiques de la BHE sont : les capillaires cérébraux, les plexus choroïdes et les villosités arachnoïdiennes (Figure 25).

1. Capillaires cérébraux

La BHE se situe donc au niveau des jonctions intercellulaires des cellules endothéliales (Figure 21). En effet, contrairement aux capillaires périphériques, les vaisseaux cérébraux ne sont pas fenestrés et leurs jonctions intercellulaires sont

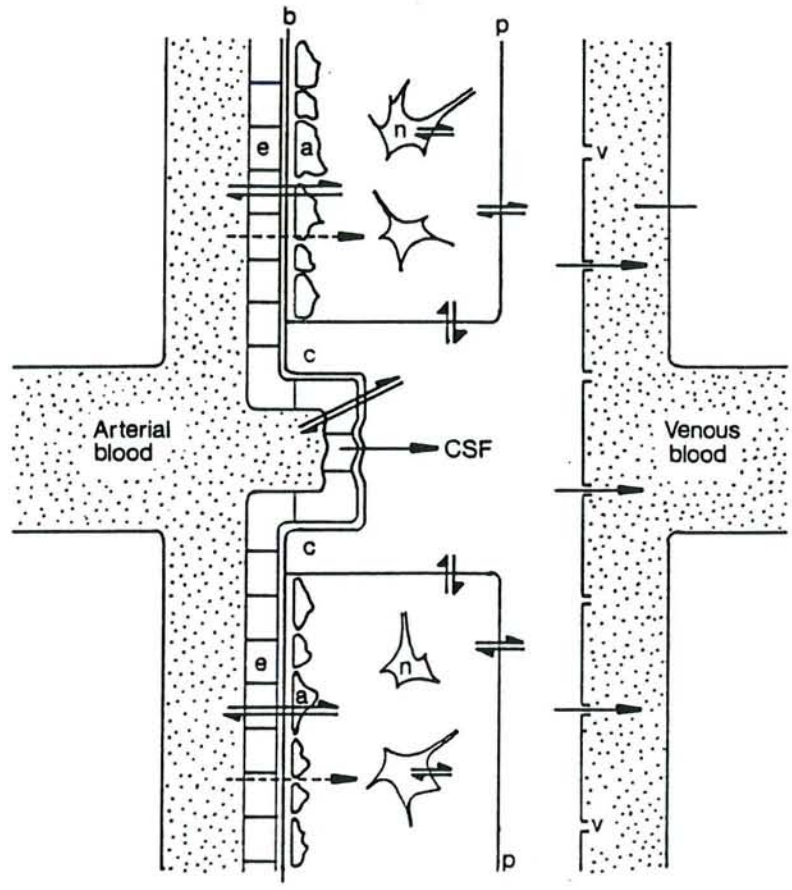


Figure 23: Diagramme schématique des relations entre les compartiments liquides dans le SNC. a: astrocyte; b: lame basale; c: plexus choroïdes; e: endothélium des capillaires; n: neurone; p: pie-mère; v: villosités arachnoïdiennes; CSF: liquide céphalo-rachidien (LCR). Les flèches entières indiquent la direction du flux de LCR; les demi-flèches indiquent les sites possibles de diffusion passive de solutés; les flèches en pointillé indiquent les sites de transport facilité de certaines molécules (dans Bates, 1985).

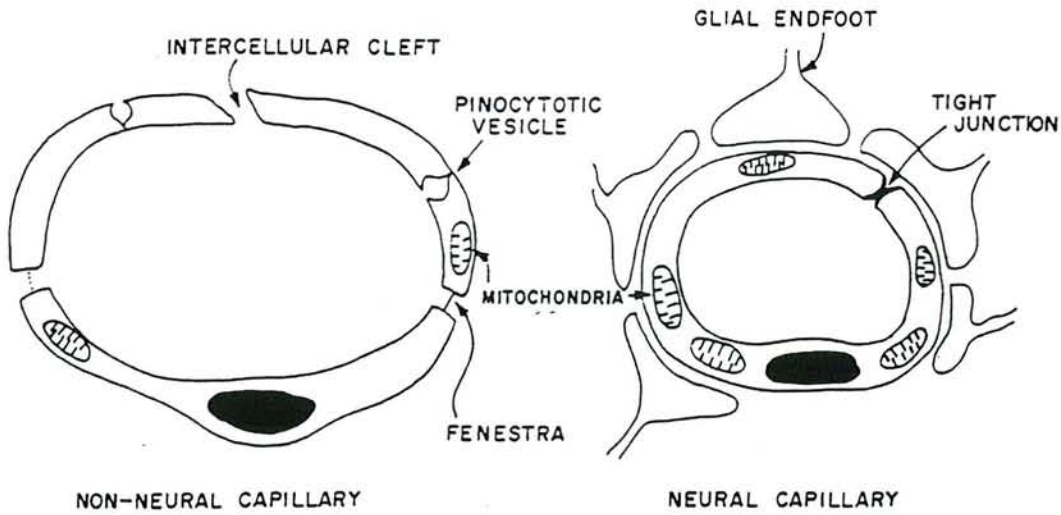


Figure 24: Schéma représentant les principales caractéristiques anatomiques différenciant les capillaires cérébraux des capillaires périphériques. La nature des jonctions intercellulaires, la présence ou l'absence de vésicules de pinocytose et de fenestrations, les pieds astrocytaires et la richesse en mitochondries, principalement, différencient ces deux types de capillaires (dans Reed, 1980).

étanches, il s'agit de jonctions serrées ou "tight junctions" (Figure 24). De plus, les cellules endothéliales cérébrales contiennent très peu de vésicules endothéliales, et ont donc une activité de pinocytose et de transfert vésiculaire très faible. Ces cellules sont riches en mitochondries. Autour des cellules endothéliales, on trouve la lame basale puis les astrocytes qui forment une couche cellulaire relativement continue. Les jonctions interastrocytaires ne sont pas des jonctions serrées, mais des jonctions focales lacunaires ("gap junctions").

Comme nous l'avons mentionné plus haut, dans certaines régions (de très faible volume par rapport à l'ensemble du cerveau), la BHE est faible voire absente. Il s'agit notamment des régions hypophysaire et épiphysaire et de l'*area postrema*. Lorsqu'une substance a pénétré dans le cerveau, sa sortie peut se faire soit par ces régions où la BHE est interrompue, soit, comme son entrée, par franchissement des cellules endothéliales, mais elle peut également diffuser dans l'espace extracellulaire, puis dans le LCR qui est résorbé par les villosités arachnoïdiennes. De plus, quelques substances, comme la pénicilline, sont transportées activement hors du LCR par l'épithélium des plexus choroïdes.

2. Plexus choroïdes

Les plexus choroïdes sont des épithéliums très vascularisés, ayant une très forte activité sécrétrice. Ils sont localisés dans les ventricules cérébraux et assurent l'interface sang-LCR. La surface luminale est composée d'une seule couche de cellules cubiques ciliées et couvertes de microvillosités (Figure 25). Les cellules épithéliales reposent sur une lame basale qui entoure les tissus conjonctifs dans lesquels sont enchâssés le système vasculaire et les terminaisons nerveuses. Les capillaires des plexus choroïdes sont différents des capillaires cérébraux décrits ci-dessus : ils sont dépourvus de jonctions serrées, ils sont donc poreux et fenestrés. Ils permettent ainsi des échanges rapides de substances à travers l'endothélium et n'ont pas de fonction de barrière. En fait, la barrière des plexus choroïdes est associée à la couche épithéliale des plexus, qui est caractérisée par des jonctions serrées ou serrées percées ("leaky tight") sur les bords apicaux entre les cellules. Les jonctions "leaky tight" sont moins discriminantes que les jonctions serrées. Toutefois, elles limitent efficacement la diffusion des macromolécules et de composés hydrosolubles plus petits.

3. Villosités arachnoïdiennes

Les villosités arachnoïdiennes assurent l'interface LCR-sang veineux. La couche centrale des villosités arachnoïdiennes possède des jonctions serrées entre les cellules et constitue une barrière pour la diffusion des macromolécules (dans

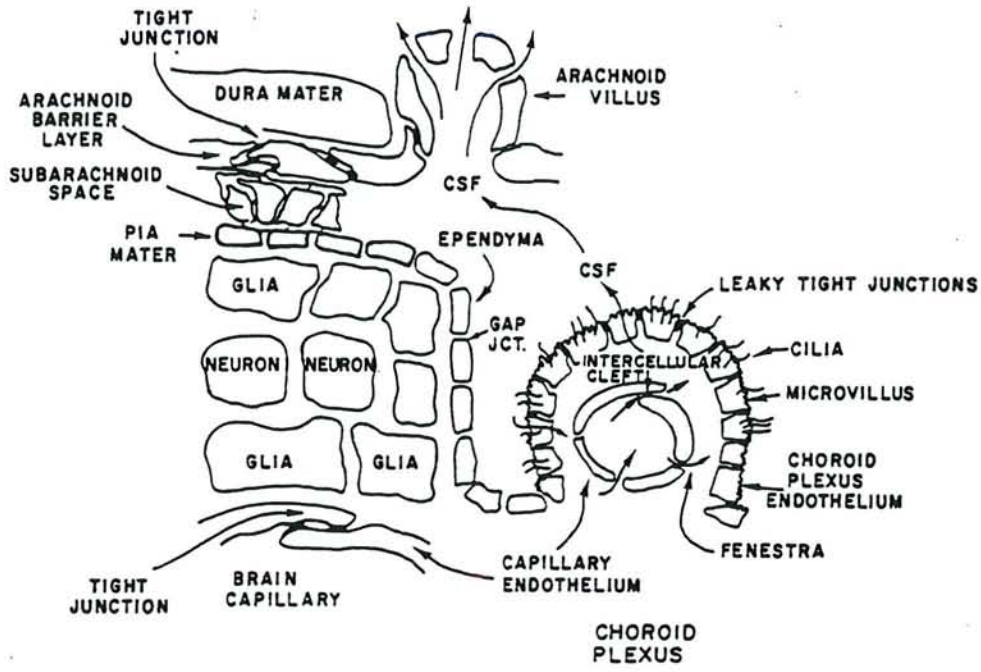


Figure 25: Présentation schématique des composantes anatomiques de la BHE en relation avec le tissu cérébral. Les jonctions serrées des capillaires cérébraux, et les cellules gliales les entourant, sont représentées en bas à gauche. Les plexus choroïdes, avec leurs capillaires différents des capillaires cérébraux, et l'épithélium choroïdal avec ses jonctions intercellulaires serrées ou serrées percées, portant des cils et des microvillosités, sont représentés à droite. Le LCR est produit par les plexus choroïdes et communique librement avec l'espace extracellulaire cérébral à travers l'épendyme. Il retourne au sang via les villosités arachnoïdiennes. Cette circulation du LCR est à l'origine de l'effet "siphon". La couche moyenne des membranes arachnoïdiennes, avec ses jonctions serrées est représentée en haut à gauche en relation avec la dure-mère et la pie-mère (dans Reed, 1980).

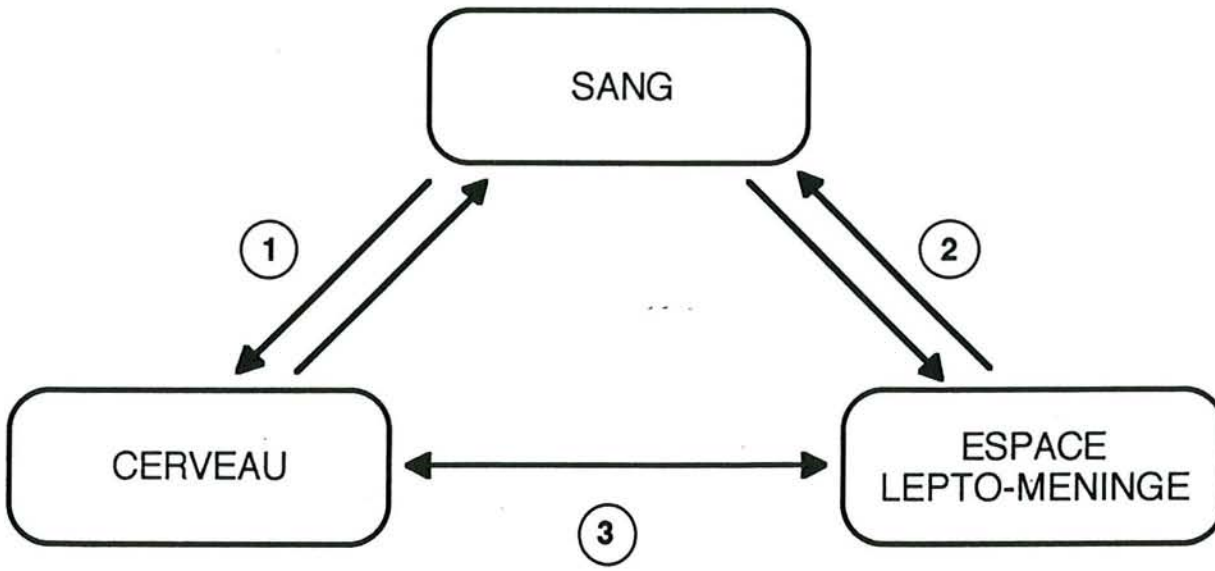


Figure 26: Sites d'échange entre le sang et les différents compartiments du SNC. 1: Interface sang/espace extra-cellulaire cérébral ou BHE; 2: Interface sang/LCR ou barrière hémato-méningée; 3: Interface LCR/espace extra-cellulaire cérébral: ce n'est pas une barrière.

Reed, 1980 ; Figure 25). Les échanges à travers cette barrière sont faibles et ont lieu surtout du LCR vers le sang veineux. Toutefois, le rôle exact qu'elle pourrait jouer en relation avec la BHE ou comme partie de la BHE n'est pas encore entièrement connu.

4. Ependyme

L'épithélium de l'épendyme qui tapisse les cavités du SNC ne constitue pas une barrière diffusionnelle entre le LCR et le tissu cérébral. Les cellules épithéliales sont jointes par des jonctions lacunaires. Même les protéines diffusent assez librement à travers l'épendyme (dans Reed, 1980 ; Figure 25). Ainsi, le LCR et le liquide extracellulaire cérébral ne sont pas séparés par une barrière effective (Figure 26).

La surface des microvaisseaux cérébraux est 5000 fois supérieure à celle des autres interfaces (plexus choroïdes, villosités arachnoïdiennes et épendyme), ces dernières contribuent donc très faiblement aux échanges.

B. Barrière métabolique

En dehors des caractéristiques morphologiques particulières des membranes endothéliales, l'organisme possède un autre moyen pour empêcher l'entrée dans le SNC. Certaines substances qui s'introduisent dans les cellules endothéliales y sont transformées en composés chimiques incapables de traverser à nouveau la membrane plasmique, et donc incapables d'atteindre le SNC. En effet, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont caractérisées, du point de vue biochimique, par un grand nombre d'enzymes oxydatives et hydrolytiques (dans Reed, 1980). Un certain nombre d'entre elles sont, d'ailleurs, impliquées dans la régulation du transport des amines et des acides aminés. C'est l'ensemble de ces processus métaboliques que l'on nomme la barrière "métabolique". Cette barrière concerne particulièrement les neurotransmetteurs et leurs précurseurs immédiats. La L-dopa, par exemple, acide aminé précurseur de la dopamine et de la noradrénaline, pénètre rapidement dans l'endothélium mais, une fois dans la cellule, elle est transformée par des enzymes en une forme qui ne peut atteindre le cerveau. L'acétylcholine et les acides aminés neurotransmetteurs, comme le GABA, sont catabolisés également. En ce qui concerne le GABA, l'enzyme qui intervient est la GABA-T. Les lysosomes présents dans la cellule endothéliale sont impliqués dans la dégradation du matériel endocytosé et participent donc, eux aussi, au rôle de barrière métabolique. Il existe, de plus, une barrière gliale pour certains composés toxiques traversant les cellules endothéliales sans atteindre les neurones, comme les acides gras libres et l'ammoniaque.

L'activité métabolique est très élevée dans l'endothélium des capillaires cérébraux, par rapport au reste du SNC. Des études récentes, sur capillaires isolés, ont montré que le métabolisme de certains médicaments était plus actif dans les cellules endothéliales que dans l'ensemble du cerveau (Ghersi-Egea *et al.*, 1988 ; Minn *et al.*, 1993). Par exemple, la NADPH-cytochrome P 450 réductase a une activité double dans les microvaisseaux de celle observée dans l'homogénat cérébral.

En résumé, pour passer du sang au cerveau, une substance doit, d'une part, franchir les deux membranes cellulaires phospholipidiques de la cellule endothéliale, ce franchissement pouvant se faire facilement si la substance est liposoluble ou si elle a été rendue liposoluble par un traitement chimique, si elle peut emprunter le transporteur d'un substrat métabolique ou si elle est transportée par un récepteur ; d'autre part, la substance ne doit pas être métabolisée entre ces deux membranes. Le cerveau est donc séparé du sang par deux barrières, l'une étant morphologique et l'autre, métabolique.

C. Considérations physiologiques

Le cerveau a un taux métabolique élevé et des réserves de substrats métaboliques très limitées. Ceci implique qu'il dépend d'un approvisionnement continu et rapide de nutriments et d'autres substances à partir du sang. De telles exigences pourraient sembler incompatibles avec le système de BHE conçu pour réguler l'environnement interne du SNC en restreignant strictement l'entrée des substances solubles non lipidiques. L'incompatibilité apparente de ces deux contraintes semble avoir été résolue par une limitation sévère de l'entrée de la plupart des substances solubles non lipidiques et, simultanément, par des mécanismes de transport spécifiques permettant d'apporter les quantités optimales de substrats métaboliques et d'autres substances essentielles au fonctionnement du SNC. Ainsi, en plus des considérations anatomiques de la BHE, plusieurs facteurs physiologiques influencent l'entrée de substances dans le SNC ou leur sortie, c'est-à-dire le transport actif, la diffusion facilitée, la pinocytose et la circulation du LCR qui est le principal responsable de l'effet de "siphon".

Il est évident que les capillaires cérébraux sont plus que de simples conduits pour le sang et qu'une barrière anatomique pour le SNC. Ils transportent activement un certain nombre de substances du sang vers le cerveau et vice versa et peuvent également les transformer.

Les capillaires cérébraux et les plexus choroïdes montrent de nombreuses similarités fonctionnelles. L'une des principales fonctions des plexus choroïdes est la

sécrétion de la plus grande partie du LCR. Etant donné que la composition du LCR et du liquide extracellulaire cérébral est très différente de celle d'un ultrafiltrat de plasma, la fonction des plexus choroïdes représente une contribution très importante au maintien de l'environnement du SNC (Reed, 1980).

Une fonction particulièrement importante des plexus choroïdes est le maintien de la composition ionique du LCR, notamment des concentrations en K^+, Mg^{++}, Ca^{++}, H^+, I^- et $HCO3^-$, qui sont très différentes des concentrations plasmatiques (Reed, 1980). Les plexus choroïdes jouent un rôle important dans l'élimination d'un grand nombre d'anions et de cations organiques du LCR et ainsi du liquide extracellulaire cérébral. Ils transportent par exemple, des métabolites acides et basiques produits par le SNC, ainsi que des substances exogènes, incluant de nombreux médicaments comme la pénicilline.

Les plexus choroïdes assurent indirectement une fonction régulatrice en sécrétant le LCR, cette sécrétion résultant du transport actif de Na^+. En effet, la sécrétion de LCR provoque une circulation importante de liquide à travers les espaces du LCR qui induit un effet de "siphon" pour des substances qui sont en concentration plus élevée dans le tissu cérébral ou dans le liquide extracellulaire cérébral (dans Reed, 1980). Comme l'épendyme n'oppose aucune résistance à la diffusion entre le liquide extracellulaire cérébral et le LCR, les substances peuvent entrer librement dans le LCR et retourner dans le sang sans avoir à traverser de membrane cellulaire. Au lieu de cela, elles sont portées par le courant de liquide à travers les ouvertures des villosités arachnoïdiennes. Il s'agit de l'effet "siphon". Les villosités arachnoïdiennes servent de valves à sens unique, elles permettent l'efflux du LCR mais empêchent son reflux. Il y a donc une perte de LCR qui fournit un mécanisme lent d'efflux non spécifique de composés hors du SNC. Ce mécanisme débarrasse le SNC des composés polaires comme les déchets métaboliques, à un niveau relativement constant, en fonction de leur poids moléculaire. Par conséquent, alors que la lipophilie est très importante pour l'entrée d'une substance dans le SNC, sa sortie ne dépend que partiellement de ce paramètre : une substance polaire et n'ayant aucune affinité pour l'un des mécanismes d'efflux actif ou passif de la BHE, quittera le SNC par l'intermédiaire de l'efflux massif de LCR.

D. Processus de passage à travers la BHE

La BHE régule les échanges en restreignant ou en facilitant le passage de différentes substances dans les deux sens. La perméabilité de la BHE ressemble à celle d'une membrane cellulaire, elle se laisse traverser par des composés lipophiles ne dépassant pas une certaine taille. Une substance peut passer de plusieurs façons à travers une membrane cellulaire : par franchissement de la phase phospholipidique, par des systèmes de transport facilité ou par des systèmes de récepteurs. Ainsi, les

molécules hydrophiles ou de poids moléculaire élevé ne la traversent pas. Mais, il existe des transporteurs spécifiques dans les membranes des cellules endothéliales qui transportent activement certaines molécules. Les principaux processus intervenant dans la traversée de la BHE sont donc : la diffusion passive, la diffusion facilitée et le transport actif.

1. Diffusion simple

Le passage transmembranaire d'une molécule non ionisée et non liée aux protéines se fait par diffusion simple, suivant son gradient de concentration. Si la perméabilité de la substance à travers cette phase lipidique est grande, son passage dans le SNC dépendra également de la vitesse du débit sanguin cérébral. C'est le cas pour de nombreux anesthésiques, de l'éthanol, de la nicotine et de l'héroïne. Par contre, les substances très hydrophiles, quelle que soit leur taille, de l'albumine aux ions Na^+, traversent peu ou pas la BHE. La perméabilité de la BHE pour une substance est proportionnelle au coefficient de partage de la substance non ionisée entre une solution organique, censée représenter la membrane, et une solution aqueuse. On utilise généralement pour exprimer ce processus, le coefficient de partage octanol/eau. Cette perméabilité est également inversement proportionnelle à la racine carrée du poids moléculaire. Ce facteur peut, en pratique, limiter le passage de substances lipophiles de haut poids moléculaire, comme les liposomes. Enfin, certaines substances sont présentes, dans le sang, sous forme ionisée et non ionisée. La proportion relative de ces deux formes dépend du pH sanguin et de la constante de dissociation ionique de la substance. Une molécule ionisée étant hydrophile, c'est donc seulement sous la forme non ionisée que les substances peuvent franchir la phase lipidique d'une membrane.

En ce qui concerne les substances liées aux protéines plasmatiques, on considérait jusqu'ici qu'elles ne franchissaient pas la BHE. Mais des études récentes ont montré que de telles substances peuvent la traverser, sans être accompagnées de la protéine (dans Lefauconnier & Hauw, 1989). Un tel phénomène pourrait résulter d'une modification du site de liaison de la substance à la protéine plasmatique, qui ferait suite à des interactions transitoires entre cette protéine et la paroi vasculaire cérébrale. Cette modification dépend non seulement de la substance en cause mais aussi de la protéine. Par exemple, la constante de dissociation (Kd) du propanolol lié à l'albumine n'est pas différente *in vitro* et dans la microcirculation cérébrale. Si le propanolol est lié à une glycoprotéine, le Kd *in vivo* dans les capillaires cérébraux est plusieurs fois supérieur à ce qu'il est *in vitro*. Donc, pour connaître la vitesse de passage d'une substance, il faudrait mesurer systématiquement le Kd *in vitro* et *in vivo*, dans les capillaires cérébraux.

2. Diffusion facilitée et transport actif

Pour fonctionner, le cerveau consomme notamment des substances qui ne sont pas liposolubles, comme le glucose, la principale source d'énergie des cellules cérébrales, et certains acides aminés que les cellules cérébrales ne synthétisent pas. Pour que ces substances indispensables puissent traverser la BHE, il existe des systèmes capables de les reconnaître et de leur faire traverser la membrane plasmique. Ces systèmes de transport facilité permettent le passage des métabolites du sang au cerveau et vice versa.

Les membranes antiluminale et luminale sont différentes, en particulier par leurs systèmes de transport. De nombreux systèmes de transport ont été décrits du sang vers la cellule endothéliale et de celle-ci vers le cerveau en ce qui concerne les oses, les acides monocarboxyliques, les acides aminés, les amines, les purines, les nucléosides, les ions, les peptides, etc... Un certain nombre de molécules pénètrent grâce à un transporteur encore inconnu. Citons par exemple, certains médicaments faiblement basiques qui pénètreraient sous forme ionisée : le propanolol, la lidocaïne, les amphétamines (Lefauconnier & Hauw, 1989).

Les systèmes de transport ont des degrés de spécificité très variables. Chaque système transporte au moins une substance endogène, comme des substrats métaboliques, des nutriments ou des métabolites. Ces substances endogènes représentent probablement les substrats fondamentaux des systèmes de transport. Toutefois, si un médicament ou une autre substance exogène est présent et remplit les conditions du transporteur, par exemple la configuration moléculaire ou la charge, alors il sera transporté de manière compétitive par ce système. Certains transports sont unidirectionnels, d'autres sont bidirectionnels, ce qui peut augmenter ou diminuer la concentration du médicament dans le SNC. Ces systèmes de transport assurent soit une diffusion facilitée, soit un transport actif. En ce qui concerne la diffusion facilitée, il existe des récepteurs qui transportent leurs ligands en les internalisant. C'est le cas par exemple pour le glucose, les gros acides aminés neutres et les acides monocarboxyliques. Le transport actif par contre, demande de l'énergie, ce qui explique la présence de beaucoup de mitochondries dans l'endothélium.

C'est le transporteur spécifique des hexoses qui a été découvert le premier (dans Bodor & Brewster, 1983b). La spécificité des transporteurs hémato-encéphaliques est surprenante. Par exemple, le D-glucose et le L-glucose sont deux stéréo-isomères du glucose. L'organisme tolère aussi bien le D- que le L-glucose, mais seul le D-glucose est biologiquement actif. Or, le D-glucose passe très rapidement du sang vers le tissu cérébral, alors que le cerveau n'extrait pas le L-glucose. Le transporteur des hexoses, qui se trouve dans l'endothélium des capillaires cérébraux, a donc une très forte affinité pour le D-glucose. Il est Na^+-dépendant. Le transport du

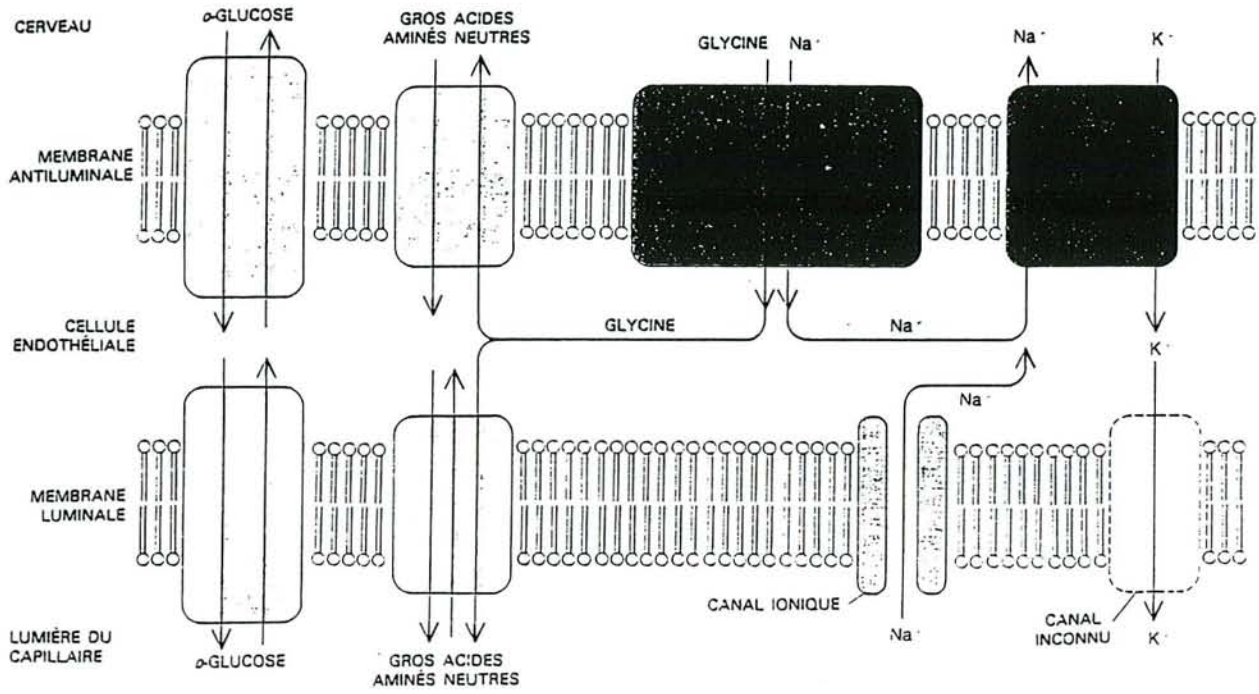


Figure 27: Schéma représentant la disposition de certains transporteurs dans les membranes luminale et antiluminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Certains transporteurs accélèrent simplement la diffusion osmotique (couleur claire); d'autres sont des mécanismes actifs qui consomment de l'énergie (couleur sombre). Le D-glucose et les gros acides aminés neutres comme la phénylalanine pénètrent dans le cerveau grâce à des transporteurs situés dans les deux membranes de la cellule endothéliale; ces substances peuvent, grâce à leurs transporteurs, traverser la BHE dans les deux sens. Les ions K^+ et les petits acides aminés neutres, comme la glycine, ne passent que du cerveau vers le sang. Ils sont expulsés du cerveau par des transporteurs actifs présents surtout dans la membrane antiluminale. Le mouvement de la glycine est couplé à celui des ions Na^+, qui lui fournissent l'énergie nécessaire. L'énergie du transport des ions K^+ provient de la dissociation d'une molécule d'ATP par l'ATPase; les ions Na^+ sont simultanément pompés dans le cerveau. La glycine pourrait quitter l'endothélium grâce aux transporteurs des gros acides aminés neutres. Les ions K^+ quittent l'endothélium par un canal encore inconnu (dans Goldstein & Betz, 1986).

glucose augmente avec la concentration en glucose dans le sang, mais seulement jusqu'à un certain point au-delà duquel la vitesse de transport n'augmente plus, il est donc saturable. Toutefois, dans les conditions physiologiques, il n'est jamais saturé. Dans l'endothélium des capillaires cérébraux, les transporteurs du glucose sont présents à la fois dans les membranes luminales et antiluminales, de sorte que le glucose puisse traverser complètement l'endothélium (Figure 27).

Il existe un système de transport des acides monocarboxyliques, comme l'acide acétique, l'acide lactique et les corps cétoniques. Ces molécules peuvent servir de substrat de remplacement pendant les périodes où l'apport en glucose est insuffisant, par exemple en cas de jeûne ou d'allaitement.

Le transport des acides aminés est complexe. En fonction de leurs propriétés chimiques, les acides aminés peuvent être classés en gros acides aminés neutres, petits acides aminés neutres, acides aminés basiques et acides aminés acides. Il existe plusieurs types de transporteurs pour les acides aminés :

* Les **acides aminés neutres** se divisent en gros et en petits acides aminés neutres. Les vitesses de transport dans le cerveau sont très différentes pour ces deux catégories. Les acides aminés neutres jouent un rôle particulièrement important, car ils sont nécessaires à la synthèse cérébrale des neurotransmetteurs et des protéines. Plus de dix des gros acides aminés neutres utilisent le même transporteur pour entrer dans les cellules endothéliales (Goldstein & Betz, 1986). De même que les transporteurs du glucose, les transporteurs des gros acides aminés neutres sont présents à la fois dans les membranes luminales et antiluminales (Figure 27). Ces acides aminés "essentiels" peuvent ainsi atteindre le tissu cérébral. Par contre, les petits acides aminés neutres ne sont pas transportés du sang vers le cerveau. En effet, les cellules cérébrales synthétisent les petites molécules. En outre, l'un au moins des petits acides aminés neutres, la glycine, est un neurotransmetteur inhibiteur, dont la concentration doit rester bien inférieure, autour des cellules nerveuses que dans le sang. Toutefois, Goldstein & Betz (1986) ont mis en évidence, *in vitro*, un système de transport capable de concentrer la glycine dans les cellules endothéliales. Les auteurs ont proposé un modèle de répartition asymétrique des transporteurs : le transporteur des petits acides aminés neutres doit être présent dans la membrane antiluminale uniquement. Ainsi, ces acides aminés peuvent être évacués du cerveau, mais n'y sont pas introduits (Goldstein & Betz, 1986).

Il existe donc une répartition asymétrique des transporteurs des deux cotés des cellules endothéliales. Quand le glucose et les gros acides aminés sont transportés du sang vers le cerveau, ils passent d'une concentration assez élevée à une concentration bien inférieure. C'est donc le gradient de concentration lui-même qui

fournit l'énergie du transport, et les transporteurs ne font que faciliter la diffusion qui se produirait sans eux, mais plus lentement. En revanche, pour qu'un composé passe d'une région de faible concentration à une région de concentration plus forte, comme dans le cas de la glycine, il lui faut de l'énergie. Dans le cas des petits acides aminés neutres comme la glycine, cette énergie provient des ions Na^+ qui rentrent dans l'endothélium sous l'action de leur propre gradient de concentration (Figure 27). Ces acides aminés ressortent ensuite des cellules endothéliales, par la face luminale, probablement grâce aux transporteurs des gros acides aminés neutres (Goldstein & Betz, 1986).

Certains métabolites passent du cerveau vers le sang grâce à des systèmes différents de ceux qui existent pour le passage sang-cerveau. En ce qui concerne les acides aminés neutres, par exemple, on connaît un seul système d'entrée, le système L (leucine) et trois systèmes de sortie, les systèmes A (alanine), ASC (alanine, sérine, cystéine) et L.

* Le système de transport des **acides aminés basiques** est bidirectionnel et saturable, certains auteurs l'ont nommé système Ly^+ (dans Bodor & Brewster, 1983b).

* Le système de transport des **acides aminés acides** a une affinité importante pour l'acide glutamique et est complètement saturé aux concentrations physiologiques.

Un système de transport des purines a été isolé (dans Bodor & Brewster, 1983b). Les purines, contrairement aux pyrimidines, ne peuvent pas être synthétisées dans le SNC. L'activité de ce transporteur est élevée chez le nouveau-né puis diminue avec l'âge.

En ce qui concerne le transport des amines, c'est par diffusion facilitée que la choline entre dans le cerveau où elle est utilisée pour la synthèse de l'acétylcholine et de certains phospholipides. En effet le tissu cérébral ne synthétise pas de choline.

Récemment, un transporteur pour les hormones thyroïdiennes a été décrit. La thyroxine et la triiodothyronine son transportées au niveau de la BHE, par des systèmes indépendants et unilatéraux, la thyroxine étant transportée du cerveau vers le sang et la triiodothyronine du sang vers le cerveau. Par contre, la tyrosine et l'ion iodure ne sont pas transportés.

Les prostaglandines et plus généralement les eicosanoïdes sont produits dans le cerveau où leur métabolisme est faible, et ils sont éliminés par un système de transport spécifique au niveau des plexus choroïdes, et peut-être au niveau de la BHE.

Il est évident qu'il existe un système de transport des nucléosides, comme l'adénosine et la guanosine, et des vitamines, mais sa localisation est incertaine sauf pour la thyamine qui possède deux transporteurs dans les capillaires cérébraux. On pense qu'il est localisé surtout dans les plexus choroïdes (Bates, 1985).

Il existe un système de transport des électrolytes : la Na^+-K^+-ATPase assure le transport des ions Na^+ et K^+. De même que la glycine, les ions K^+ exercent une action importante sur la transmission des influx nerveux, et leur concentration est maintenue à un faible niveau dans le liquide extracellulaire cérébral. Ces deux substances ont un autre point commun : la membrane luminale de l'endothélium leur est relativement imperméable. Les ions K^+ sortent du cerveau par un système de transport saturable (dans Goldstein & Betz, 1986). Ce transport est actif comme celui de la glycine, c'est-à-dire qu'il s'effectue contre un gradient de concentration. Mais les mécanismes de ces deux types de transport actif sont différents : la membrane antiluminale contient une enzyme, la Na^+-K^+-ATPase, en plus grande quantité que la membrane luminale (Figure 27). L'ATPase constitue une pompe qui transporte simultanément les ions Na^+ de l'endothélium vers le SNC et les ions K^+ du SNC vers l'endothélium, dans les deux cas contre un gradient de concentration. L'énergie nécessaire est fournie par l'hydrolyse de l'ATP en ADP. Les ions K^+ ressortent des cellules endothéliales probablement par des pores dans la membrane luminale (Goldstein & Betz, 1986 ; Figure 27). Ce système permet donc à l'endothélium de maintenir une concentration faible en K^+ dans le SNC et de se débarrasser lui-même des ions K^+ en excès, grâce à la répartition asymétrique de l'enzyme de pompage entre les deux faces de la cellule endothéliale. On remarque que le Na^+ intervient à la fois dans le transport du K^+ et dans celui des acides aminés neutres.

Les peptides possèdent un système de transport. En effet, des récepteurs peptidiques ont été découverts récemment au niveau de la BHE (Pardridge, 1991). Des études ont montré que le transport de l'insuline et de la transferrine était effectué par des récepteurs vers l'espace interstitiel cérébral. On appelle ce processus transcytose médiée par récepteur. Elle comporterait trois étapes :

- une endocytose médiée par le récepteur du coté sanguin de la BHE ;
- la diffusion du peptide ou du complexe récepteur-peptide à travers le cytoplasme endothélial ;
- l'exocytose médiée par le récepteur à travers la membrane antiluminale dans l'espace interstitiel cérébral.

Dans les plexus choroïdes, un nombre similaire de systèmes de transport a été observé (dans Reed, 1980). Parmi les substances transportées, on trouve le glucose, les acides aminés, les acides et bases organiques, les ions inorganiques et les vitamines. En plus des systèmes de transport, il existe dans les plexus choroïdes, des mécanismes d'efflux actif, des transporteurs ayant notamment été décrits pour les anions, l'ion iodure et les cations.

E. Conséquences pharmacologiques

Pour pouvoir exercer son action sur le tissu cérébral, une substance neuroactive doit être capable de traverser la BHE. Plusieurs facteurs régissent ce passage.

1. Facteurs influençant le passage des médicaments à travers la BHE

a. Lipophilie

La lipophilie de la substance va influencer fortement son passage de la phase aqueuse du plasma à la membrane plasmique lipidique des cellules endothéliales. Pour mesurer la nature lipophile d'une molécule, on peut utiliser le coefficient de partage lipide/eau. Oldendorf (1975 dans Reed, 1980) a montré que les substances ayant des coefficients de partage lipide/eau supérieurs à 0.04 sont rapidement éliminés du plasma vers le SNC. C'est le cas, par exemple, de l'éthanol, de la nicotine et de la caféine. En-dessous de 0.02, l'entrée dans le cerveau est très lente (exemple : acide ascorbique, acide acétylsalicylique).

b. Degré d'ionisation et liaison aux protéines

Les facteurs augmentant la nature hydrophile d'une substance vont réduire sa capacité à pénétrer dans le SNC. Ces facteurs sont la charge ionique, le pK_a (pourcentage d'ionisation) et enfin, la liaison aux protéines et à l'hydrogène. En raison de la forte affinité des molécules chargées pour un environnement aqueux, seule la fraction non ionisée est considérée comme libre de diffuser à travers la membrane. C'est pourquoi, le pK_a de la substance et le pH du plasma vont déterminer la fraction de substance qui sera non ionisée. Rapaport (1976 dans Reed, 1980) a montré que le paramètre de partition P* était une approximation acceptable du taux de transfert des médicaments du plasma au SNC. P* est égal au produit de la concentration de la fraction de médicament non ionisée dans une solution aqueuse et de la liposolubilité du médicament non ionisé mesurée par le coefficient de partage lipide/eau.

Le pH sanguin est relativement stable, il a donc des effets minimes sur les changements de perméabilité de substances à travers la BHE, à l'exception toutefois, des substances ayant un pK_a proche de 7.4 pour lesquelles même de légères modifications du pH sanguin vont produire des changements importants du degré d'ionisation.

c. *Affinité pour un système de transport*

Par ailleurs, l'entrée d'un médicament dans le SNC dépend de sa capacité à traverser la BHE par transport actif ou diffusion facilitée. En effet, certaines substances traversent la BHE en utilisant les transporteurs spécifiques présents dans les capillaires, si leur structure est proche de celle des substrats endogènes. C'est le cas, par exemple, de certains médicaments dérivés d'acides aminés neutres comme la L-dopa ou des amphétamines qui pénètrent, au moins en partie, par diffusion facilitée.

En résumé, d'une part, si une substance est significativement liposoluble (rapport lipide/eau > 0.02-0.04), alors elle entrera facilement dans le cerveau. Cependant, si la liposolubilité est trop grande, il peut être difficile de maintenir des taux cérébraux adéquats, car la substance aura tendance à quitter le cerveau rapidement et à s'accumuler dans divers tissus adipeux. D'autre part, l'accessibilité au cerveau de petites molécules hydrosolubles (rapport lipide/eau < 0.02) est fortement réduite par la BHE. On peut augmenter le passage d'une molécule en réduisant sa charge et sa capacité à former des liaisons hydrogènes. La liaison aux protéines peut également influencer le taux cérébral d'une substance, puisque seule la fraction libre est capable d'entrer dans le SNC. De plus, si la fraction liée aux protéines est très importante, elle peut représenter un grand réservoir de substance susceptible d'être libéré par inadvertance par l'administration de substances compétitives pour la liaison, et une forte toxicité peut en résulter. Si une substance remplit les conditions de transport par un ou plusieurs systèmes de transport dans les capillaires ou les plexus choroïdes, son taux d'entrée ou de sortie du SNC peut être modifié d'une manière très importante. On peut éviter cela, au moins en partie, en administrant une substance qui entre en compétition pour le transport.

2. Atteinte de la BHE dans certains états pathologiques ou expérimentaux

On sait que la BHE peut être affectée dans un certain nombre de conditions pathologiques ou induites expérimentalement (dans Bodor & Brewster, 1983b). L'effet produit peut être le résultat de changements des composantes structurales des capillaires cérébraux comme les jonctions ou l'activité de pinocytose. Dans ce cas, on

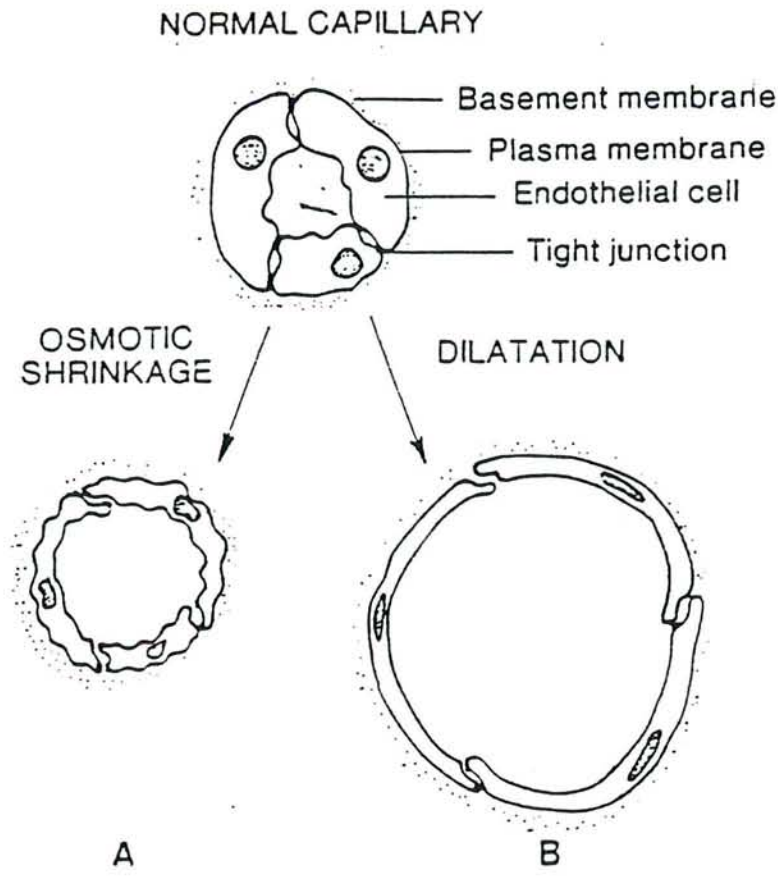


Figure 28: Méthodes d'ouverture de la BHE par injection carotidienne d'une solution hyperosmotique (A) ou par hyperpression dans le capillaire (B) comme cela se produit, par exemple dans l'hypertension aigüe (dans Bustany, 1983).

observe une augmentation généralisée de la perméabilité. Ou bien, l'atteinte de la BHE peut être localisée au niveau des systèmes de transport et produire des changements de perméabilité spécifiques. Dans le cas d'une augmentation généralisée de la perméabilité, si des protéines plasmatiques ou d'autres composés entrent dans le SNC, cela s'accompagne d'une entrée massive d'eau et provoque un œdème cérébral.

Les bases morphologiques de ces changements de perméabilité sont souvent controversées, en particulier pour le traitement hyperosmotique des capillaires cérébraux. En effet, on peut ouvrir la BHE par perfusion carotidienne de solutions hyperosmolaires, ce qui provoque une augmentation rapide et importante de la perméabilité de la BHE. D'après certains auteurs, la solution hyperosmotique provoque une évacuation d'eau par les cellules endothéliales qui diminuent de volume, ce qui entraîne l'ouverture des jonctions serrées et donc de la BHE (dans Bodor & Brewster, 1983b ; Figure 28). Mais d'autres auteurs suggèrent que l'augmentation de la perméabilité résulte d'une augmentation du transport vésiculaire induite, grâce à un mécanisme encore inconnu, par l'élévation locale de la pression sanguine. En effet, l'examen ultrastructural des capillaires cérébraux ne montre ni lésion des capillaires ni ouverture des jonctions (dans Bodor & Brewster, 1983b). Dans tous les cas, l'ouverture de la BHE est transitoire et réversible, et ne produit pas d'œdème. Ce genre d'ouverture de la BHE peut se produire *in vivo*, principalement dans les poussées hypertensives où l'augmentation de la tension artérielle provoque l'ouverture de la barrière (Figure 28). C'est pourquoi, l'hypertension est une maladie majeure qui peut produire un certain nombre de complications débilitantes et dans certains cas, une maladie rare, l'encéphalopathie hypertensive.

On observe également une atteinte de la BHE dans les tumeurs cérébrales primaires et dans les cancers cérébraux secondaires métastatiques. Dans ces régions, les jonctions serrées sont détruites, les capillaires sont fenestrés et présentent des jonctions lacunaires, ce qui a amené à penser que ces déficiences permettraient de traiter les tumeurs. Malheureusement, les expériences cliniques ont montré que ce n'est pas le cas et de nombreux agents utilisés en chimiothérapie sont efficaces contre les tumeurs périphériques, mais inefficaces contre leurs métastases secondaires cérébrales. Ceci s'explique par deux phénomènes : d'abord, c'est surtout dans la portion centrale, à croissance lente, que la structure des capillaires est désintégrée, et plus on se déplace vers la périphérie de la tumeur, plus les anomalies vasculaires diminuent ; ensuite, comme seule une superficie assez faible des vaisseaux cérébraux est perturbée, tout médicament qui atteint le néoplasme diffuse rapidement dans les aires environnantes, et sa concentration ainsi que son efficacité sont diminuées d'autant dans la tumeur (dans Bodor & Brewster, 1983b). L'infarctus cérébral perturbe également le fonctionnement de la BHE.

TRAITEMENT	Nombre d'animaux	Atteinte de la BHE[a]			Pression artérielle moyenne (mm Hg)	
		0	1	2	Avant la crise	Après la crise
PTZ (100mg/kg)	12	4	5	3	108 ± 6	165 ± 7*
10 électrochocs	12	7	5	0	111 ± 7	163 ± 8*
Contrôle	5	5	0	0	104 ± 11	-

Tableau 11: Effet du PTZ et des électrochocs sur la pression artérielle moyenne et sur la perméabilité de la BHE. [a]: L'estimation visuelle de la diffusion du Bleu Evans dans le SNC a été portée sur une échelle de 0 à 2 où 0 = aucune; 1 = légère; 2 = moyenne. *: Test de Student par rapport au lot contrôle, $p < .001$ (d'après Öztas & Sandalci, 1984).

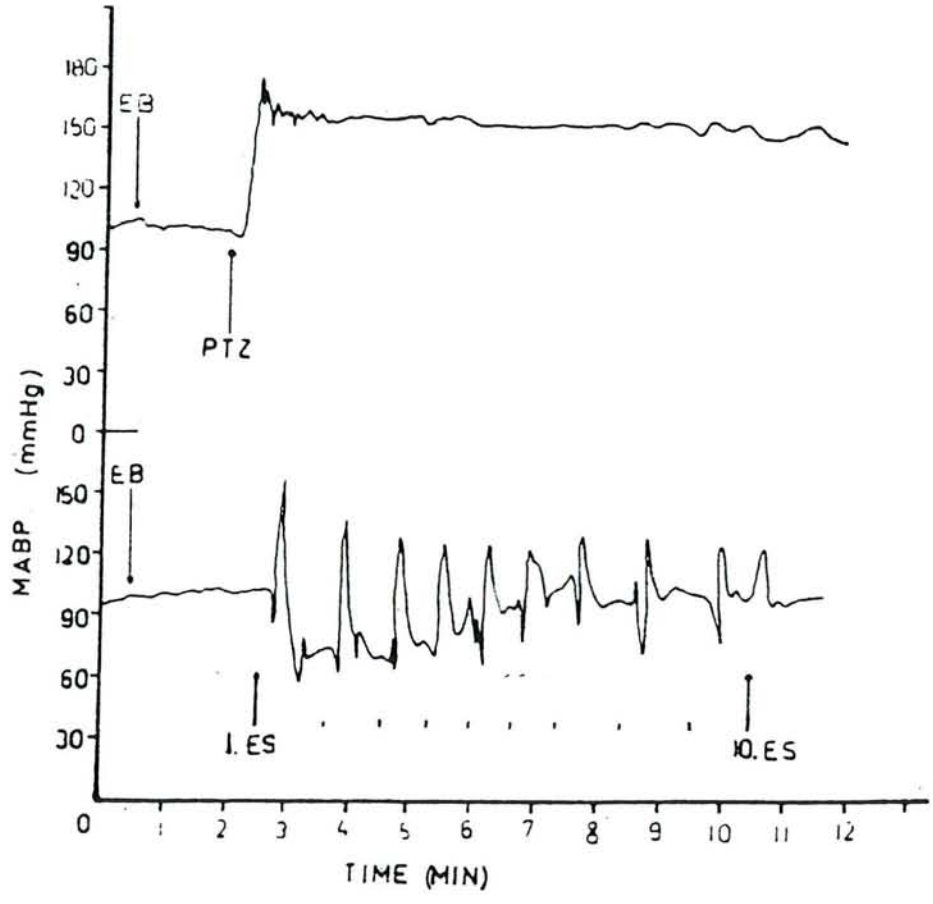


Figure 29: Moyenne de la pression artérielle (MABP) des rats après administration i.v. de PTZ (100 mg/kg) ou durant l'administration de 10 électrochocs (ES). EB = Injection i.v. de Bleu Evans (dans Öztas & Sandalci, 1984).

Les chocs électroconvulsifs de même que les crises induites par le PTZ provoquent une augmentation de la perméabilité capillaire cérébrale à de nombreux marqueurs plasmatiques, l'importance de l'augmentation de perméabilité étant proportionnelle au nombre de chocs ou à la quantité de composé administré (Öztas & Sandalci, 1984). Les convulsions induites électriquement ou chimiquement s'accompagnent également d'une élévation de la pression sanguine qui pourrait être responsable de l'augmentation de perméabilité. La perméabilité de la BHE est augmentée de façon plus importante par les crises induites par le PTZ que par les crises induites par les chocs électriques (Tableau 11 ; Öztas & Sandalci, 1984). En ce qui concerne l'élévation de la pression sanguine, l'amplitude est la même dans les deux cas (Tableau 11), mais sa durée est différente : les convulsions induites par le PTZ provoquent une élévation soutenue de la pression artérielle pendant toute la durée de l'expérience (10 mn), alors que les convulsions induites électriquement provoquent, immédiatement après chaque choc, une élévation suivie d'une baisse rapide en vingt à trente secondes, la pression maximale atteinte diminuant avec le nombre de chocs (Figure 29). On peut donc supposer que l'hypertension continue est l'un des facteurs nécessaires pour accroître la perméabilité de la BHE.

3. Différentes méthodes développées pour libérer les médicaments dans le SNC

Du point de vue clinique, le problème fondamental consiste à faire traverser la BHE à des médicaments susceptibles d'agir sur le SNC, afin de traiter des maladies neurologiques. Certains médicaments, comme le chloramphénicol (antibiotique), sont très liposolubles et pénètrent facilement dans le SNC. En revanche, de nombreux autres médicaments, notamment les pénicillines, sont très peu liposolubles et ne pénètrent que très difficilement, voire pas du tout, dans le SNC. On peut, dans le cas de substances très peu toxiques comme les pénicillines, administrer de très fortes doses. La forte concentration sanguine permet de compenser, en partie, la faible lipophilie et augmente le passage dans le SNC. Mais le plus souvent, cette méthode provoque des effets secondaires ou toxiques importants.

La première technique utilisée pour faire pénétrer dans le SNC des substances traversant peu ou pas la BHE, a été d'administrer la substance directement dans le LCR. L'injection peut être réalisée au niveau lombaire, cisternal ou ventriculaire à l'aide d'un cathéter (Figure 30). Mais, dans ces conditions, elle diffuse préférentiellement à la surface du cerveau, plutôt que dans le parenchyme cérébral. Cette technique est donc surtout utile pour les affections méningées. En chimiothérapie par contre, les injections intrathécales sont appliquées depuis longtemps, pour le traitement des tumeurs cérébrales. Malheureusement, pour

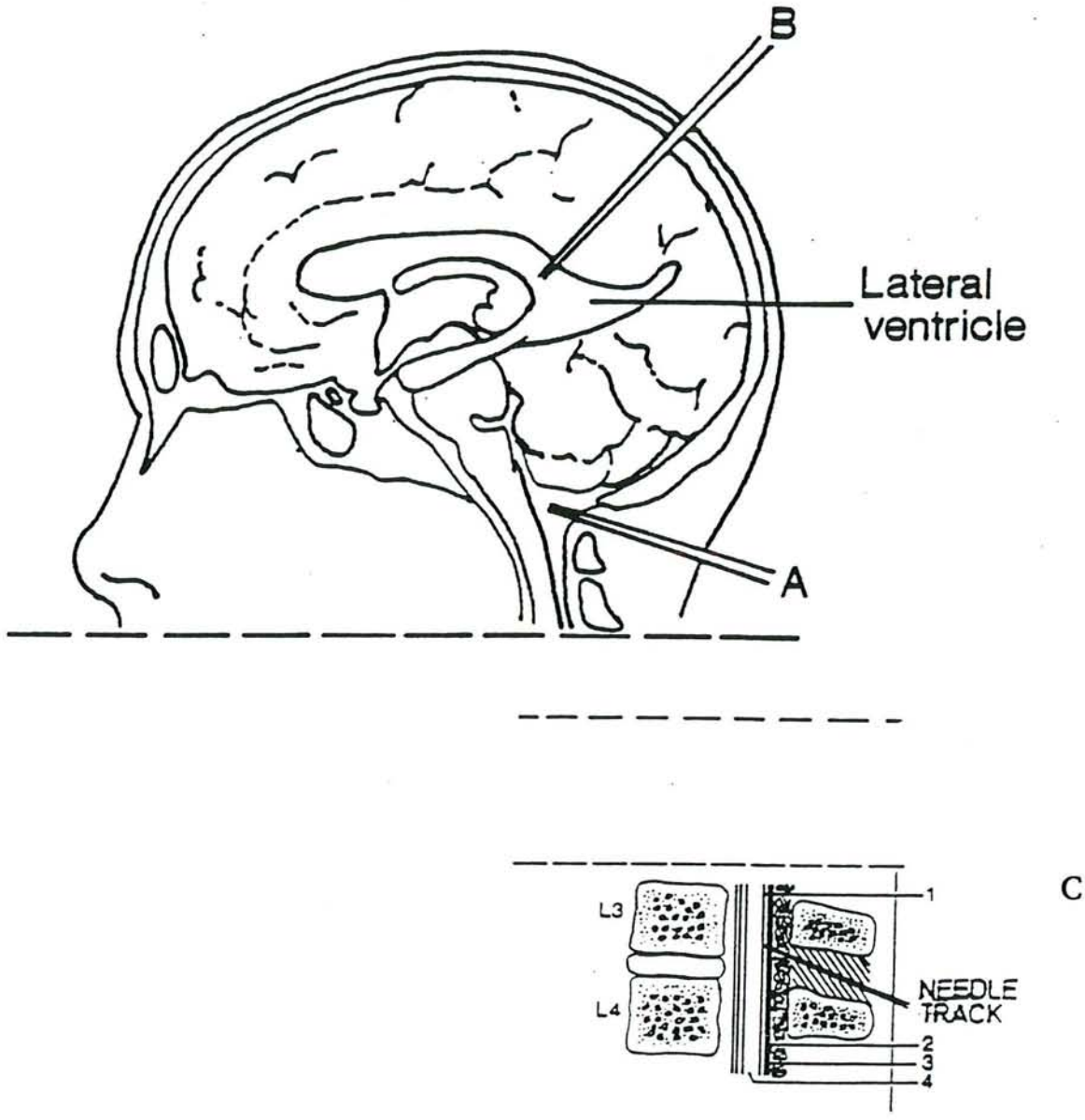


Figure 30: Méthodes d'injection directe de substances dans le SNC. A: injection cisternale; B: injection ventriculaire; C: injection lombaire; 1: espace sous-arachnoïdien; 2: dure-mère; 3: villosités arachnoïdiennes; 4: moelle épinière (dans Bates, 1985).

limiter le nombre d'injections, il faut souvent administrer de grandes quantités de médicaments, et la toxicité de nombreux agents chimiothérapiques produit parfois des effets secondaires graves. Par ailleurs, des risques liés à la pose du cathéter, aux variations de la pression intracérébrale, du pH ou de l'osmolarité sont importants et limitent cette technique à des pathologies graves. Cette technique a cependant été reconsidérée au cours des dernières années, grâce à des tentatives de mise au point de pompes implantables, de systèmes de polymères implantables et biodégradables (Peterson, 1989), et de transplantations de tissu neural (Harbaugh, 1989). Des injections i.c.v. par cathéter ont notamment été testées en clinique dans des cas de maladie d'Alzheimer (Harbaugh, 1989).

Une seconde technique consiste à ouvrir la BHE, comme nous l'avons déjà décrit, par perfusion carotidienne de solutions hyperosmolaires, ce qui provoque une augmentation rapide, transitoire et réversible de la perméabilité de la BHE (Figure 28). Cette technique d'ouverture réversible de la BHE a été utilisée pour l'absorption tumorale d'agents antinéoplasiques chez l'homme, mais elle reste expérimentale à cause des inconvénients liés aux injections dans l'artère carotide interne.

Une autre possibilité est l'utilisation de facteurs chimiques modifiant les propriétés de la substance et facilitant son passage à travers la BHE : modification de la lipophilie, de l'ionisation, de la liaison aux protéines, utilisation de substances ayant un transporteur dans la BHE, etc.... En pratique, seule l'augmentation de la lipophilie a été, jusqu'à présent, employée avec succès. On peut par exemple, enfermer les substances hydrosolubles dans des liposomes pour leur faire franchir la BHE. Mais le poids moléculaire élevé des liposomes entrave leur passage. Par ailleurs, ils sont captés préférentiellement par le foie et la rate, ce qui rend difficile leur diffusion vers le cerveau (Lefauconnier & Hauw, 1989). On peut aussi envisager de faire pénétrer des substances en les couplant à un peptide transporté facilement, grâce à une liaison qui doit pouvoir être hydrolysée. Par exemple, la β-endorphine a été couplée à l'albumine cationisée qui, contrairement à l'albumine native, traverse la BHE. Le peptide franchit alors la barrière (dans Lefauconnier & Hauw, 1989).

Une méthode plus générale, le principe des prodrogues, consiste à modifier des médicaments chimiquement et transitoirement, par exemple en masquant leurs groupements polaires pour augmenter leur passage à travers les membranes cellulaires. La prodrogue doit être inactive mais redonner le médicament actif *in vivo*. Ainsi, la prodrogue traverse la BHE et le composé initial est réobtenu par transformation enzymatique ou chimique. Cette méthode a été largement expérimentée dans différentes classes de médicaments (antibiotiques,

antinéoplasiques, mydriatiques, anxiolytiques et antiépileptiques par exemple), la plupart des prodrogues synthétisées jusqu'à présent étant des esters simples ou des amides (Bodor & Brewster, 1983b). Ces composés redonnent l'acide, l'alcool ou l'amine d'origine grâce aux hydrolases présentes *in vivo*. Mais, l'augmentation de la lipophilie n'est pas spécifique et augmente également la diffusion dans les autres organes et par la même occasion, les effets secondaires systémiques. Par conséquent, la non spécificité est l'un des défauts majeurs du principe des prodrogues. De plus, la molécule initiale n'est pas toujours réobtenue et des métabolites indésirables ou toxiques peuvent apparaître.

Une façon plus élégante et plus spécifique consiste à utiliser la perméabilité sélective de la BHE et les propriétés métaboliques du SNC. Le principe est de modifier chimiquement le médicament pour qu'il soit capable de traverser la BHE et qu'il soit ensuite métabolisé dans le SNC en une forme incapable de retraverser la BHE. Il est donc piégé dans le SNC et y produit un effet local intense. Prenons le cas de l'héroïne et de la morphine. Ces deux molécules se ressemblent beaucoup. La seule différence est que la molécule d'héroïne possède deux groupes acétyles (CH_3CO) là où la molécule de morphine comporte des groupes hydroxyles (OH). Grâce à cette différence, l'héroïne est très liposoluble contrairement à la morphine, et pénètre beaucoup plus rapidement dans le SNC. Après le passage de la BHE, l'héroïne est transformée, par des enzymes cérébrales, en morphine qui est moins liposoluble et reste piégée dans le SNC. Mais, l'inconvénient majeur de cette méthode est que, comme pour toutes les prodrogues, l'héroïne diffuse dans tout l'organisme.

Bodor *et al.* (1981) ont tenté d'améliorer la spécificité de ce principe vis-à-vis du SNC et l'ont appliqué à différents médicaments, en les couplant à un noyau dihydropyridine, fortement liposoluble. Dans le SNC, les enzymes oxydatives cérébrales peuvent transformer cette base en sel de pyridinium quaternaire, et le médicament est ainsi piégé dans le SNC. Ce sel est lui-même hydrolysé pour redonner le médicament et une substance non neurotoxique. En périphérie également, les enzymes oxydatives transforment la base en sel de pyridinium, mais contrairement à ce qui se passe dans le SNC, ce sel est rapidement éliminé en raison de sa charge ionique et de son caractère hydrophile. Ainsi, dans les organes périphériques, la concentration en médicament est très faible, alors que le médicament est libéré de façon spécifique et soutenue dans le SNC. Il s'agit de la méthode des SLC qui a été appliquée à plusieurs catégories de médicaments et que nous nous sommes proposés d'appliquer au GABA.

IV. LES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE (SLC)

A. Historique

De grands progrès ont été réalisés, en ce qui concerne la libération de médicaments dans le cerveau, grâce aux travaux effectués avec un sel quaternaire polaire, le chlorure de *N*-méthylpyridinium-2-carbaldoxime (2-PAM). Cette substance est un médicament de choix pour le traitement des intoxications par des organophosphates et exerce son effet en réactivant une enzyme désactivée lors de l'intoxication, l'acétylcholinestérase (dans Bodor & Brewster, 1983b). Plus précisément, cette enzyme ayant été désactivée par phosphorylation, est réactivée par une attaque nucléophile du 2-PAM. Malheureusement, les phosphates organiques sont très lipophiles et diffusent rapidement dans tout l'organisme, y compris le SNC. Pour réactiver les enzymes cérébrales, le 2-PAM doit donc être libéré dans le SNC. Or, étant donné que le 2-PAM est un sel de pyridinium quaternaire, il ne traverse pas la BHE et est inefficace vis-à-vis des intoxications centrales. Sa nature polaire limite sa distribution mais favorise également son élimination, ce qui raccourcit sa demi-vie biologique. De nombreux analogues du 2-PAM ont été synthétisés pour résoudre ces problèmes mais se sont tous avérés moins actifs que le 2-PAM. Bodor *et al.* (1975), plutôt que de rechercher des analogues, se sont intéressés aux problèmes de distribution du 2-PAM lui-même. Après injection i.p. à des souris, on retrouve 44% de la dose de 2-PAM injectée dans les urines, 20% seulement dans les organes viscéraux et enfin, très peu de 2-PAM atteint le SNC (dans Bodor & Brewster, 1983b). C'est pourquoi, les auteurs ont enlevé la charge positive du 2-PAM en réduisant chimiquement ce composé quaternaire pour obtenir la dihydropyridine correspondante (Bodor *et al.*, 1975, 1976 ; Shek *et al.*, 1976a,b). Cette réduction produit une amine tertiaire beaucoup plus lipophile que le 2-PAM. Or, les dihydropyridines substituées sur l'atome d'azote sont relativement instables et rapidement oxydées pour redonner le composé quaternaire. C'est ce système rédox qui est la base d'un système de coenzymes important, le système $NADH \leftrightarrow NAD^+$. Ainsi, la première étape consistait à synthétiser le dihydro-2-PAM, mais cette molécule s'est avérée très instable (Bodor *et al.*, 1976). Par conséquent, les auteurs ont fabriqué une prodrogue du 2-PAM, le 1-méthyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime ou pro-2-PAM qui a plus d'affinité que le 2-PAM pour différents organes, y compris le cerveau, et qui est rapidement transformé en 2-PAM *in vivo*. Lorsque le pro-2-PAM est injecté par voie systémique à des souris, on trouve treize fois plus de 2-PAM dans le cerveau que lorsqu'on injecte du 2-PAM (Bodor & Brewster, 1983b). Après injection périphérique de pro-2-PAM, on retrouve, dans le cerveau, 1.5% de la quantité administrée. Or, le cerveau représente 1.5% de la masse corporelle, il y a donc distribution uniforme. De plus, le pro-2-PAM n'est transformé qu'en 2-PAM c'est-à-dire qu'aucun métabolite

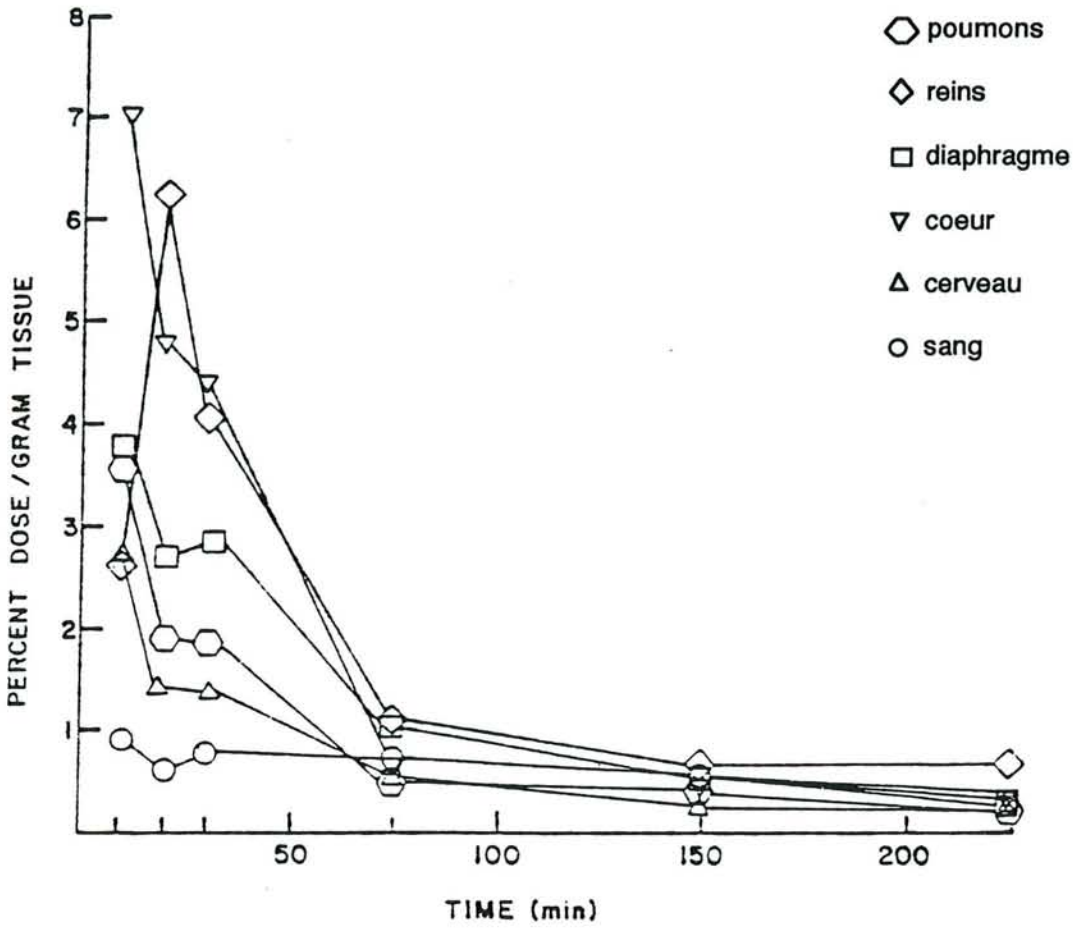


Figure 31: Efflux du 2-PAM dans les poumons, les reins, le diaphragme, le coeur, le cerveau et le sang, après une administration i.v. de pro-2-PAM à la dose de 5 mg/kg, à des souris (dans Bodor & Brewster, 1983b).

indésirable n'apparaît. L'oxydation du pro-2-PAM est très rapide *in vivo*, et aboutit, dans le cerveau, à l'accumulation de 2-PAM capable de réactiver les enzymes cérébrales phosphorylées (Bodor & Brewster, 1983b). Le pro-2-PAM montre d'ailleurs, beaucoup plus d'efficacité que le 2-PAM pour réactiver les enzymes phosphorylées.

Le choix du système rédox dihydropyridine↔ sel de pyridinium pour la libération de substances dans le cerveau semble donc être un bon choix, au moins pour le 2-PAM. Ce système permet de convertir temporairement des composés polaires en composés lipophiles et ainsi, d'augmenter leur capacité à traverser la membrane plasmique. Contrairement à l'entrée dans le SNC, l'efflux d'un composé hors du SNC n'est pas précisément proportionnel à sa lipophilie, et le 2-PAM en est l'exemple puisqu'il est rapidement éliminé dans tout l'organisme, y compris dans le cerveau, après administration systémique soit de 2-PAM, soit de pro-2-PAM. Des études détaillées ont montré que les sels quaternaires de petite taille, comme le 2-PAM, sont éliminés rapidement, probablement par des phénomènes actifs, alors que les sels quaternaires de grande taille comme la berbérine, sont éliminés lentement, vraisemblablement par des processus passifs tels que la circulation du LCR (Bodor & Brewster, 1983b). L'élimination lente des sels quaternaires de grande taille a été mise à profit dans le développement du ciblage de molécules vers le SNC puisqu'elle permet d'obtenir des concentrations élevées et soutenues en composé neuroactif dans le SNC.

Le développement du principe du système rédox dihydropyridine↔ sel de pyridinium a ensuite été orienté dans deux voies : d'une part, avec des substances neuroactives contenant des groupements pyridinium comme la berbérine (agent antinéoplasique), et d'autre part, avec des substances neuroactives, ne contenant pas ce groupement, auxquelles est rattaché chimiquement un transporteur de type pyridinium. La première voie de développement correspond à un système de prodrogues et la deuxième correspond aux systèmes de libération chimique ou SLC qui nous intéressent plus particulièrement.

B. Principe

A partir des travaux réalisés avec le 2-PAM (Shek *et al.*, 1976a,b) et la berbérine (Bodor & Brewster, 1983a), un schéma de distribution de substances actives par l'intermédiaire d'un transporteur a été élaboré (Figure 31). Il consiste à coupler chimiquement un agent pharmacologiquement actif à un transporteur de type pyridinium, qui pourrait être un acide nicotinique substitué ou la nicotinamide. Après le couplage, le complexe substance active-transporteur est réduit pour donner la dihydropyridine. Ce complexe réduit peut ensuite être administré par voie systémique. Etant donné que sa perméabilité membranaire a été augmentée, il

traverse la BHE et est distribué puis oxydé (k_{ox}) dans tout l'organisme, en particulier par les NADH déshydrogénases. La vitesse d'oxydation peut être contrôlée grâce à un positionnement judicieux des substituants sur le cycle pyridine. Lors de l'oxydation, le complexe substance active-transporteur devient polaire. C'est pourquoi, il est rapidement éliminé en périphérie par des processus rénaux et/ou biliaires ($k_{out\ 2}$) alors que dans le cerveau, ce composé est retenu en raison de sa taille et de sa charge. Le clivage de la substance active ($k_{clivage}$) et du transporteur oxydé aura lieu à la fois en périphérie et dans le SNC. Si la vitesse de clivage du complexe dans le cerveau est supérieure à la vitesse de son efflux (c'est-à-dire, $k_{out\ 1} << k_{clivage}$), on obtiendra une libération soutenue de la substance (Figure 31 ; Bodor & Brewster, 1983b).

Ce schéma a de nombreux avantages. La concentration du complexe substance active-transporteur qui, d'une manière idéale, est inactif, augmentera dans le cerveau alors qu'elle diminuera rapidement en périphérie. Cette réduction de la concentration systémique de la substance clivée permet de réduire la toxicité. De même, la concentration de la substance libérée dans le cerveau sera faible, puisque le processus de clivage est lent et prolongé. Etant donné que la substance active est libérée à partir du transporteur oxydé, le complexe substance active-transporteur n'est pas une prodrogue mais plutôt une pro-prodrogue ou SLC.

Cette méthode semble nettement supérieure aux simples prodrogues de type ester ou amide où l'on masque temporairement les groupements polaires pour permettre le passage de la BHE, car elle libère les composés spécifiquement dans le cerveau tout en maintenant une concentration périphérique faible. Ceci permet d'augmenter l'efficacité centrale de l'agent et de diminuer les effets toxiques périphériques associés. En effet, il apparaît de plus en plus évident que de simples prodrogues ne peuvent pas, dans de nombreux cas, résoudre les problèmes de distribution de médicaments. C'est pourquoi, les approches plus sophistiquées, comme celle des SLC, doivent être progressivement développées.

C. Revue bibliographique : substances actives couplées

1. SLC appliqués aux neurotransmetteurs et aux acides aminés

a. β-Phénéthylamine

La première application de ce schéma de distribution par un transporteur a été la β-phénéthylamine (Bodor & Farag, 1983a). En effet, cette molécule est un bon modèle pour diverses amines endogènes comme la dopamine, la tyrosine, l'adrénaline et la noradrénaline. Or, dans plusieurs maladies, on a pu constater des déficiences en amines biogènes. Citons par exemple le parkinsonisme, qui présente une déficience

en dopamine ou la maladie de Huntington associée à une diminution du taux de GABA. Malheureusement, ces neurotransmetteurs ne traversent pas la BHE après administration systémique, en raison de leur métabolisme rapide et de leur polarité élevée. Le principe des SLC pouvait donc contribuer à alléger ces problèmes. Après administration systémique du phénéthylamine-SLC sous la forme lipophile, la concentration du complexe oxydé augmente lentement dans le cerveau, atteint son maximum après 80 mn puis diminue lentement (Bodor & Farag, 1983a). Par contre, si on administre le complexe, toujours par voie systémique, mais sous la forme de sel quaternaire, il n'est pas détectable dans le cerveau alors que sa concentration décroît rapidement dans la circulation systémique. Ces résultats confortent le schéma des SLC proposé.

b. Dopamine

La dopamine, comme la plupart des neurotransmetteurs, ne traverse pas la BHE. Une prodrogue de la dopamine, la L-Dopa, a été employée en clinique pour le traitement du parkinsonisme, mais elle exerce une toxicité périphérique qui limite son administration. Un SLC a donc été appliqué à la dopamine (Bodor & Farag, 1983b ; Bodor & Simpkins, 1983 ; Simpkins *et al.*, 1985). Les études de distribution des complexes dopamine-transporteur ont donné de bons résultats comme dans le cas de la phénéthylamine, mais les concentrations centrales en dopamine étaient variables et les animaux ne manifestaient aucun des effets physiques provoqués par l'administration de dopamine. Pour déterminer si de la dopamine était effectivement libérée, les auteurs ont examiné l'effet du dopamine-SLC sur la sécrétion de prolactine qui est normalement inhibée par la dopamine. En effet, une diminution significative et prolongée de la sécrétion de prolactine a pu être observée après administration du dopamine-SLC (Simpkins *et al.*, 1985). Ainsi, la quantité de dopamine libérée était trop faible pour induire les effets physiques souvent indésirables, mais elle était suffisante pour provoquer les réponses pharmacologiques.

c. GABA

Le GABA est le neurotransmetteur qui traverse le plus difficilement la BHE. En effet, Kuriyama & Sze (1971) ont étudié l'influx et l'efflux cérébral du ^{3}H-GABA chez des souris et des lapins adultes, après injection de ^{3}H-GABA par voie i.p. et i.c.v., respectivement. Ils ont montré que les molécules radioactives traversant la BHE dans un sens ou dans l'autre, correspondaient uniquement à des métabolites du GABA, notamment la glutamine, et donc que le ^{3}H-GABA ne pénétrait pas dans le SNC après administration i.p. et qu'il ne quittait pas le SNC après injection i.c.v.. Le GABA est

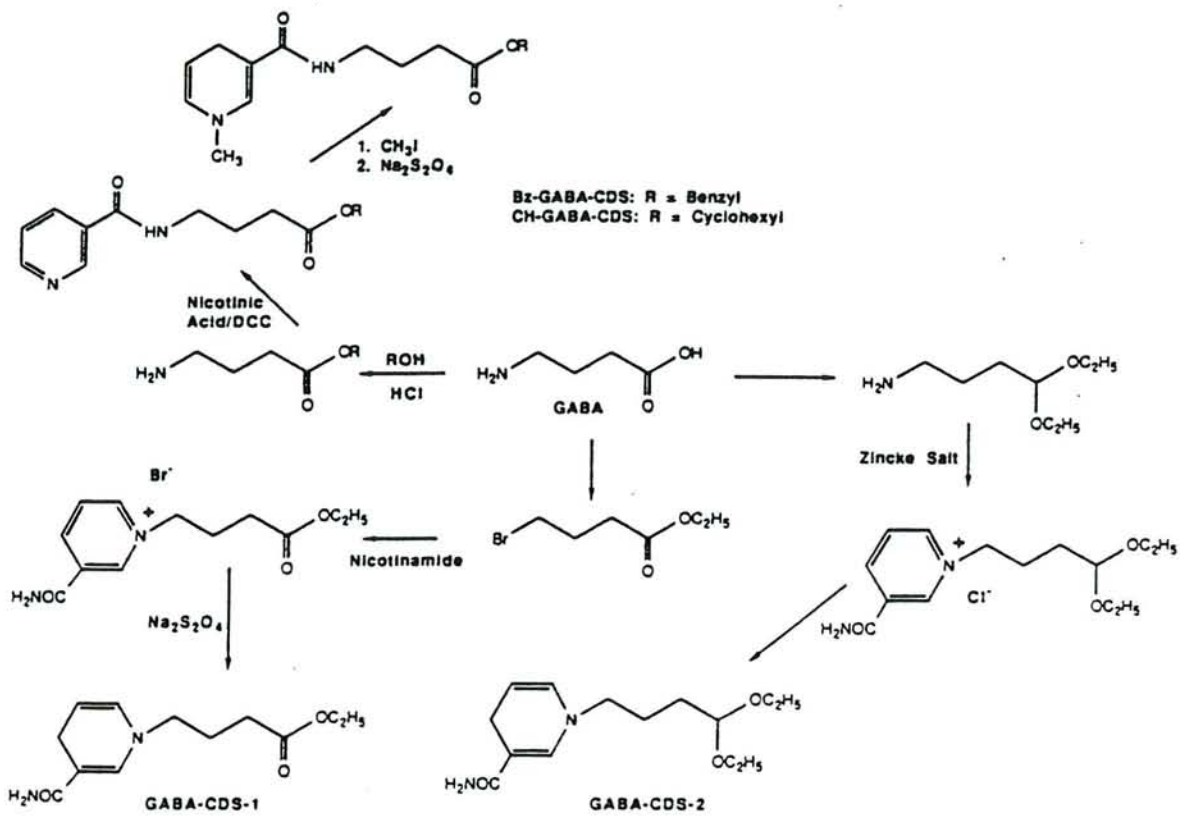


Figure 32: Synthèse des dérivés et des analogues du GABA: Dérivés du GABA: Bz-GABA-CDS = SLC14; CH-GABA-CDS = cyclohexyl-GABA-SLC; Analogues du GABA: GABA-CDS-1 = GABA-SLC-1; GABA-CDS-2 = GABA-SLC-2. DCC = dicyclohexylcarbodiimide (dans Bodor & Brewster, 1991).

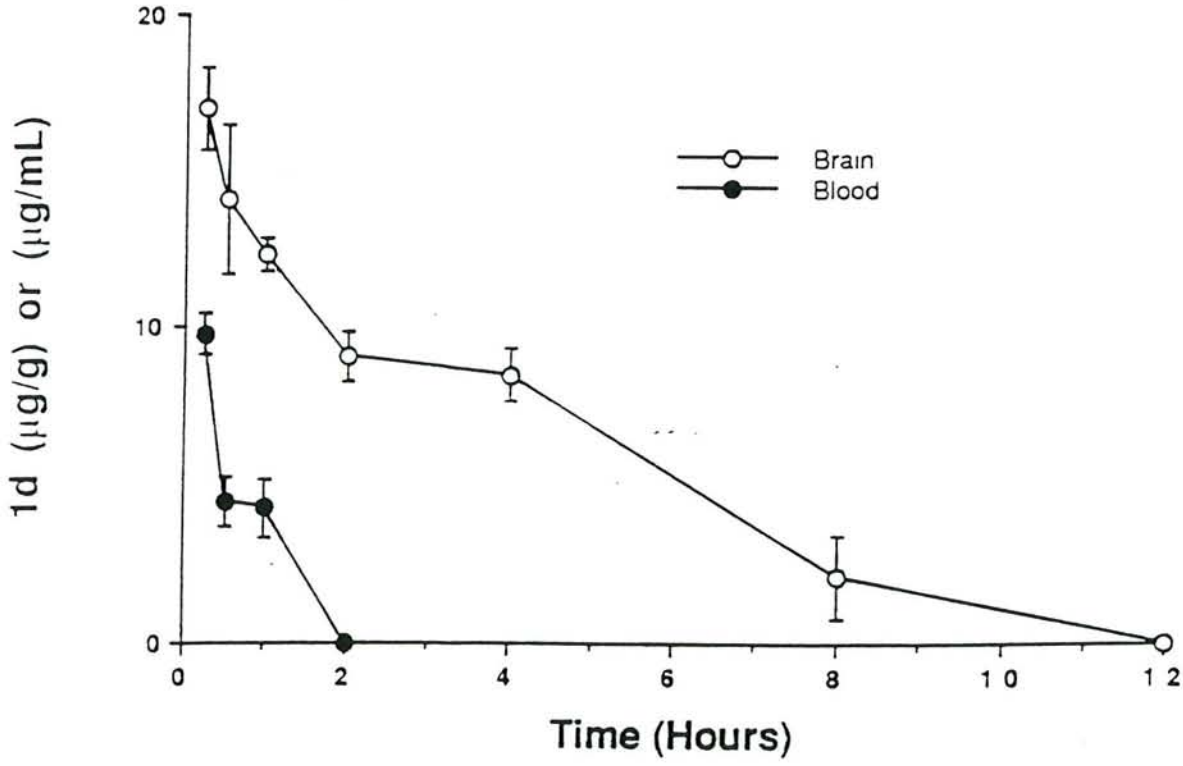


Figure 33: Distribution du SLC14 sous la forme oxydée dans le sang et le cerveau, après administration i.v. de la forme réduite du SLC14 (dans Woodard *et al.*, 1990).

très hydrophile et se trouve surtout sous forme ionisée au pH physiologique. Ainsi, les propriétés de la BHE, que nous avons décrites précédemment, expliquent bien cette imperméabilité vis-à-vis du GABA. De plus, le système de transport des acides aminés acides est saturé par le glutamate dans les conditions physiologiques. Pour "forcer" le passage de la BHE, il faut soit administrer de très grandes quantités de GABA, ce qui favorise l'apparition d'effets secondaires systémiques, soit administrer directement le GABA dans le SNC, avec les inconvénients que l'on sait. Or, au vu des propriétés neurophysiologiques et comportementales que nous avons décrites pour ce neurotransmetteur, notamment des effets anxiolytiques très probables et des effets anticonvulsivants importants, il serait très utile, pour le traitement de différents cas cliniques comme l'épilepsie ou l'anxiété, de développer une technique permettant au GABA d'accéder à son site d'action, le SNC. Pour pouvoir agir au niveau neuronal, le GABA doit donc être modifié, par exemple en augmentant sa lipophilie, grâce à la méthode des SLC.

Deux types de GABA-SLC ont été étudiés : des dérivés du GABA utilisant la trigonelline comme transporteur, le benzyl-GABA-SLC (correspondant, dans notre système de dénomination, au SLC14) et le cyclohexyl-GABA-SLC, et des analogues du GABA, le GABA-SLC-1 et le GABA-SLC-2 (Figure 32 ; Woodard *et al.*, 1990 ; Anderson *et al.*, 1987b). Woodard *et al.* (1990) ont montré que l'administration systémique du SLC14 (Figure 33) ou du GABA-SLC-2 à des rats Sprague-Dawley aboutissait à des concentrations soutenues des sels correspondants dans le cerveau pendant 12 h, alors qu'ils n'étaient plus détectables dans le sang après 2 h. Le GABA-SLC-2 n'était pas toléré par les animaux aux doses employées (5-40 mg/kg) et a donc été éliminé des expériences suivantes. L'administration de GABA-SLC-1 aboutissait à des taux centraux du sel correspondant très faibles, indiquant soit une clearance périphérique rapide et/ou l'oxydation du SLC avec formation d'une molécule incapable de traverser la BHE, soit l'hydrolyse rapide et/ou l'oxydation du GABA-SLC-1 dans le SNC. Le SLC14 montrait donc le profil de distribution le plus intéressant.

Des études neurochimiques ont montré une altération du fonctionnement des neurones GABAergiques chez les patients épileptiques. Ces données suggèrent que les agonistes GABA seraient anticonvulsivants. C'est pourquoi, l'activité anticonvulsivante du SLC14 et du cyclohexyl-GABA-SLC a été évaluée chez la souris par la technique des MES à des doses allant de 5 à 40 mg/kg (Woodard *et al.*, 1990). 1 mn après l'administration i.v. du composé, les animaux recevaient un choc électrique très court. Le SLC14 protégeait 100% des animaux à la dose de 40 mg/kg, avec une ED_{50} de 15.8 mg/kg (Figure 34). Le cyclohexyl-GABA-SLC protégeait également 100% des animaux à la dose de 40 mg/kg, mais ne montrait pas de courbe dose-réponse sigmoïdale. Le mécanisme d'action de ces composés n'a pas encore été éclairci. L'activité anticonvulsivante, contrairement à l'activité anxiolytique (Anderson *et al.*, 1987b), ne s'observe que dans des délais assez courts après l'administration, ce qui

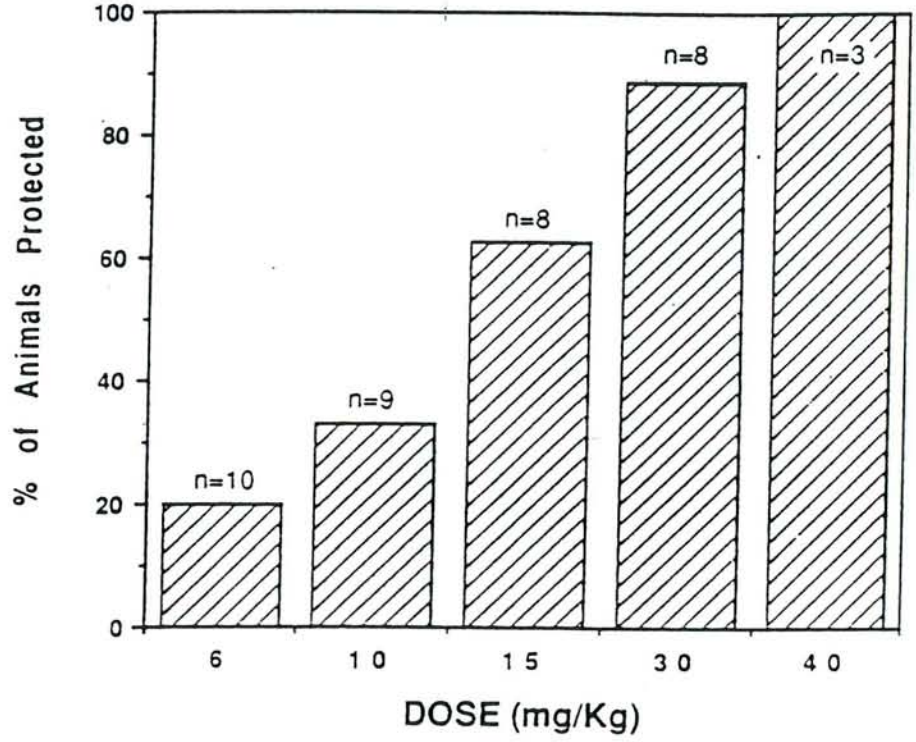


Figure 34: Protection contre l'extension tonique induite par des chocs électroconvulsifs maximaux (MES) après administration i.v. de différentes doses de SLC14 (dans Woodard *et al.*, 1990).

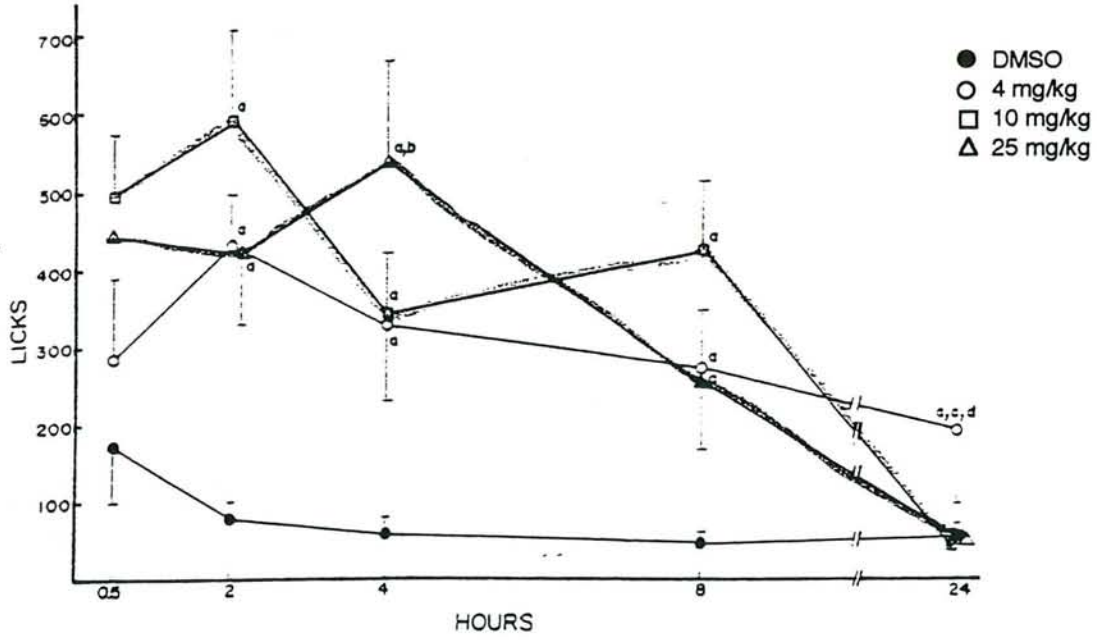


Figure 35: Effet du SLC14 sur la réponse anxiolytique de rats mâles naïfs ayant reçu du SLC14 (en solution dans le DMSO) à la dose de 0, 4, 10 ou 25 mg/kg. N = 5 à 9 animaux par traitement. Le nombre de coups de langue ("licks") est déterminé en multipliant par 7, le nombre total de secondes passées à boire en 3 mn. Chaque symbole représente la moyenne ± ES. a = différent du contrôle; b = différent de 4 mg/kg; c = différent de 10 mg/kg; d = différent de 25 mg/kg (dans Anderson *et al.*, 1987b).

suggère que le noyau dihydropyridine pourrait jouer un rôle dans l'activité anticonvulsivante (Woodard *et al.*, 1990).

Le SLC14 a, d'autre part, été évalué sur le plan anxiolytique dans une procédure de conflit choc-boisson (Anderson *et al.*, 1987b). Des doses de 4 à 25 mg/kg (i.v.) provoquaient une augmentation significative de l'anxiolyse des animaux qui se prolongeait pendant 8 h (Figure 35). On observait une augmentation dose-dépendante jusqu'à 10 mg/kg, mais aucune augmentation supplémentaire à 25 mg/kg. Cet effet anxiolytique n'apparaissait pas après administration du véhicule seul, du GABA seul ou du SLC14 sous la forme oxydée (Figure 36). L'absence d'activité sédative a été vérifiée grâce à l'openfield, aux doses 4, 10 et 25 mg/kg, mais uniquement 2 h après le traitement (Figure 37). Les auteurs ont également vérifié que l'augmentation du nombre de chocs reçus par les animaux, lors du test de conflit choc-boisson, n'était pas liée à un effet analgésique du SLC14 : ils ont employé 2 procédures d'évaluation de l'analgésie : le test de retrait de la queue ("tail flick") qui évalue l'analgésie modulée au niveau spinal, et le test de léchage de la patte ("paw lick") qui évalue l'analgésie modulée au niveau central. En effet, dans les 2 tests, ils ont montré que la latence d'apparition des réponses à la douleur n'était pas statistiquement différente par rapport aux contrôles, et ceci pendant les 4 h suivant l'injection i.v. de SLC14 à la dose de 10 mg/kg (Figure 38 ; Anderson *et al.*, 1987b).

d. Tryptophane

L'hypertension affecte un pourcentage important de la population et, si elle n'est pas traitée, elle peut provoquer différentes maladies débilitantes. L'un des moyens disponibles pour la traiter est l'utilisation de tryptophane. Cet acide aminé essentiel est utilisé en pharmacologie comme nutriment, mais depuis peu, il est également employé comme antidépresseur. Il montre une activité hypotensive chez les animaux et chez l'homme. On ne connaît pas encore son mode d'action, mais dans toutes les hypothèses émises, le cerveau est proposé comme site d'action (dans Bodor & Brewster, 1991). Or, des doses systémiques élevées sont nécessaires pour modifier significativement sa concentration centrale, qui peuvent provoquer un cancer de la vessie ou l'éosinophilie (dans Bodor & Brewster, 1991). Pop *et al.* (1990) ont donc élaboré un tryptophane-SLC qui, à la dose de 14.2 mg/kg, réduisait significativement la pression sanguine chez le rat.

e. Tryptamine

La tryptamine est une amine dérivée du tryptophane présente en concentrations très faibles dans l'organisme mais qui exerce une myriade d'effets biologiques dans le SNC de mammifère, y compris des effets sur la température

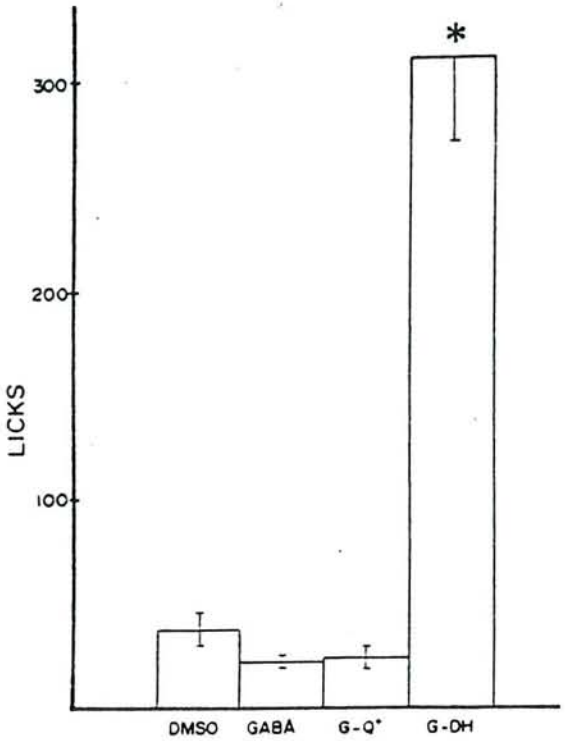


Figure 36:
Effets du GABA, d'un GABA-SLC, le SLC14, soit sous la forme oxydée (G-Q+) soit sous la forme réduite (G-DH) sur la prise de boisson dans un test de conflit. N = 8 par groupe. * = P < .05 par rapport à tous les autres groupes (ANOVA et test de Student-Newman-Keuls) (dans Anderson *et al.*, 1987b).

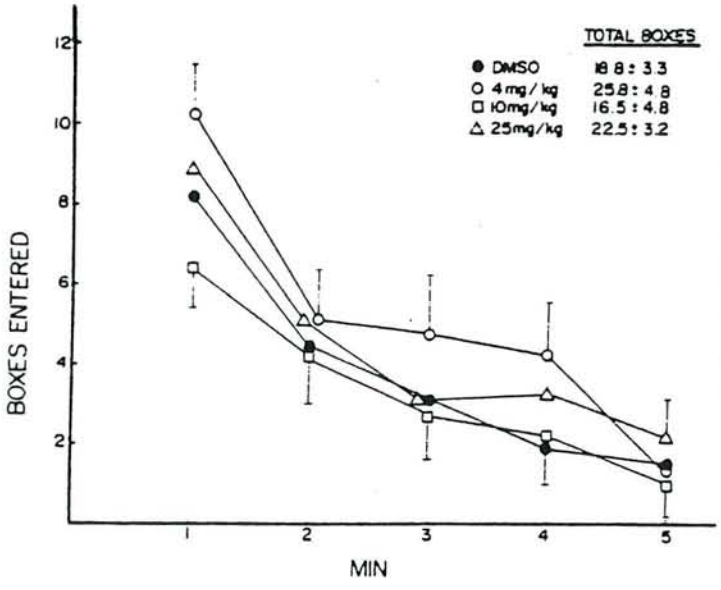


Figure 37:
Mesure de la sédation chez des rats mâles, 2 h après l'administration de SLC14 à la dose de 4, 10 ou 25 mg/kg, ou du véhicule d'injection (DMSO). "Boxes entered" indique le nombre de cases dans lesquelles l'animal place ses pattes par mn pendant une période de 5 mn. N = 8 par groupe. Aucune différence statistiquement significative n'est détectée au seuil de 5% (dans Anderson *et al.*, 1987b).

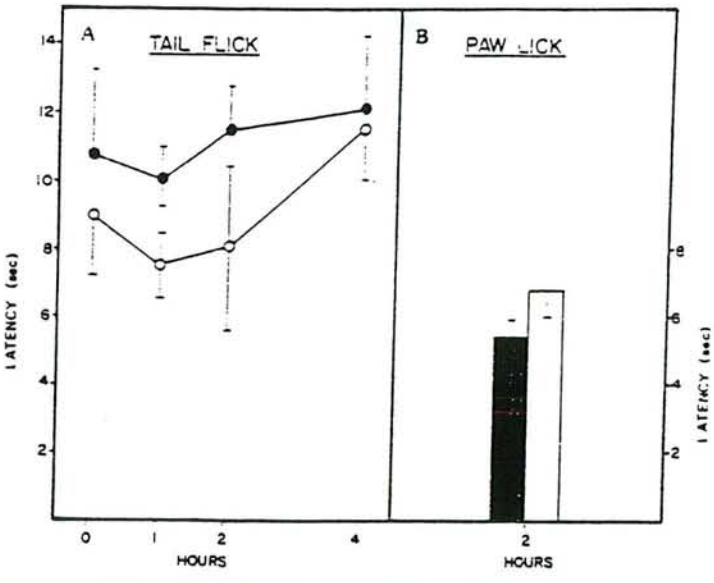


Figure 38:
Mesure des effets analgésiques du SLC14 chez des rats mâles par une procédure de retrait de la queue, 0, 1, 2 ou 4 h après l'administration i.v. (**A**) ou par une procédure de retrait de la patte, 2 h après l'administration i.v. (**B**). Noir = SLC14 à 10 mg/kg; Blanc = DMSO, véhicule d'injection. Aucune différence statistiquement significative n'est détectée au seuil de 5% (dans Anderson *et al.*, 1987b).

corporelle et sur le comportement (dans Bodor *et al.*, 1986b). De plus en plus, on pense que la tryptamine serait d'une part, un neuromodulateur, qui potentialiserait ou antagoniserait l'action de la sérotonine, et d'autre part, un neurotransmetteur par lui-même avec des effets et une distribution différents de la sérotonine. La tryptamine pénètre difficilement dans le SNC et constitue un substrat pour la monoamine oxydase (MAO). Pour que l'ensemble de ses effets biologiques et neurochimiques se manifeste, l'administration de fortes doses et/ou l'administration simultanée d'inhibiteurs de la monoamine oxydase (IMAO) sont nécessaires. Le principe des SLC a donc été appliqué à la tryptamine (Bodor *et al.*, 1986b). Ce tryptamine-SLC pourrait notamment être employé dans le traitement de la dépression qui s'accompagne en effet, de taux anormalement faibles de tryptamine (dans Bodor *et al.*, 1986). Après administration systémique, le tryptamine-SLC traverse la BHE puis est oxydé pour donner la forme quaternaire qui s'accumule dans le SNC et est rapidement éliminée dans les tissus périphériques à l'exception du coeur. On ne connait pas encore les raisons de l'élimination lente du sel quaternaire dans le tissu cardiaque, il s'agit peut-être d'une interaction du groupement indole de la tryptamine avec le coeur.

2. SLC appliqués aux stéroïdes

Plus tard, le SLC a été appliqué à une classe de composés très importante, les stéroïdes (revue dans Bodor & Brewster, 1991). Cette application était intéressante d'une part sur le plan clinique, étant donné que la libération d'hormones sexuelles dans le cerveau pourrait être utile dans diverses situations cliniques, notamment la contraception ou les dysfonctions sexuelles comme l'impuissance. D'autre part, sur le plan chimique, les stéroïdes-SLC étaient intéressants à aborder, car les stéroïdes sont de grosses molécules et la liaison substance active-transporteur est une liaison ester. Cela permettait d'étendre le principe des SLC à des molécules plus grosses et de tester la liaison ester.

Dans un premier temps, un SLC a été développé pour la testostérone, le transporteur étant de type trigonelline (Bodor & Farag, 1984). En effet, une déficience en testostérone dans le cerveau peut causer des dysfonctions sexuelles, y compris l'impuissance, mais pourrait également jouer un rôle dans différents types de cancer. De plus, dans le développement d'un testostérone-SLC, la barrière sang-testicules devrait être prise en compte (dans Bodor & Brewster, 1983b). Cette barrière, tout comme la BHE, empêche le passage de certains composés, mais vers les tubules séminifères. Contrairement à la BHE, elle n'est pas localisée dans des vaisseaux sanguins mais au niveau des jonctions serrées des cellules de Sertoli qui entourent l'appareil spermatogène. Les propriétés principales de ces deux barrières sont

similaires. Ainsi, le système rédox dihydropyridine ↔ sel de pyridinium devrait concentrer la testostérone à la fois dans les testicules et dans le cerveau. Toutefois, les études de distribution du testostérone-SLC ont été réalisées avec des rats femelles (Bodor & Farag, 1984) et aucune étude n'a été réalisée en ce qui concerne la barrière sang-testicules. La méthode des SLC permet d'obtenir une libération constante, à une concentration assez faible mais suffisante pour obtenir un effet pharmacologique, de la testostérone dans le cerveau. Par la suite, la technique a été améliorée par Bodor & Abdelalim (1986), qui ont élaboré un deuxième type de testostérone-SLC, encore plus efficace que le premier, en utilisant un transporteur de type nicotinamide.

Les œstrogènes sont des stéroïdes lipophiles qui pénètrent facilement dans le SNC. Après administration périphérique, ils traversent rapidement la BHE et atteignent des concentrations centrales élevées. Malheureusement, ils ne sont pas retenus par le cerveau et s'en échappent aussi facilement qu'ils y entrent. C'est pourquoi, ces stéroïdes doivent être administrées fréquemment pour maintenir des concentrations centrales thérapeutiques significatives. Or, une exposition périphérique constante a été liée a un certain nombre de conditions pathologiques, y compris le cancer, l'hypertension et l'altération du métabolisme (dans Bodor & Brewster, 1991). Etant donné que le SNC est le site d'action d'un grand nombre des effets des œstrogènes, un système de libération spécifiquement cérébrale de ces composés pourrait procurer des œstrogènes plus sûrs et plus efficaces. Du point de vue pharmacologique, un œstrogène-SLC pourrait être utilisé pour réduire la sécrétion de LHRH et par conséquent de LH et des stéroïdes gonadiques. L'œstrogène-SLC pourrait ainsi être employé pour la contraception ou pour réduire la croissance des tumeurs périphériques stéroïdes-dépendantes, comme celles du sein, de l'utérus et de la prostate, ou bien encore pour traiter l'endomètriose. Par ailleurs, la libération cérébrale accrue d'œstradiol pourrait s'avérer utile pour stimuler le comportement sexuel mâle et femelle, ou bien pour traiter le syndrôme de ménopause dans lequel la diminution des œstrogènes provoque de nombreux symptômes vasomoteurs. D'autres utilisations potentielles de l'œstrogène-SLC, et pour lesquelles les œstrogènes sont actuellement évalués, sont la réduction de poids et le traitement de la dépression et de différents types de démences, y compris la maladie d'Alzheimer (dans Bodor & Brewster, 1991).

Plusieurs SLC ont été synthétisés pour la stéroïde naturelle la plus puissante, l'œstradiol (Bodor *et al.*, 1987, Brewster *et al.*, 1988b) mais également pour des dérivés de l'œstradiol (Brewster *et al.*, 1988a). Simpkins *et al.* (1986) ainsi que Estes *et al.* (1987) ont montré que, chez le jeune rat castré, une seule administration d'œstradiol-SLC provoquait une libération spécifiquement cérébrale et soutenue d'œstradiol qui induisait une suppression durable de la sécrétion de LH pendant 4 à 12 jours. Une seule injection d'œstradiol-SLC à des rats mâles âgés de 18 mois, induit une

réduction prolongée de la sécrétion de testostérone et une perte de poids significative après 2 jours, perte qui se poursuit jusqu'à la fin de l'expérience (14 jours) (Anderson *et al.*, 1988a). Cependant, dans cette expérience, l'œstradiol-SLC ne modifie pas la sécrétion de LH ni des autres hormones de l'hypophyse antérieure. La réduction de la sécrétion de LH n'est pas liée au taux circulant d'œstradiol, ce qui suggère une action locale de l'œstradiol dans le SNC (Anderson *et al.*, 1988b). La suppression chronique de testostérone dans le sérum provoquée par l'œstradiol-SLC induit, par ailleurs, une diminution de poids des tissus androgénodépendants, c'est-à-dire de la prostate et des vésicules séminales (Anderson *et al.*, 1991 ; Rahimy *et al.*, 1991). Chez le rat obèse, Simpkins *et al.* (1988) ont observé, après une injection d'œstradiol-SLC, une perte de poids corporel persistante. Par contre, chez des jeunes rats maigres, ils n'ont constaté qu'une réduction de la vitesse de prise de poids. D'autre part, Anderson *et al.* (1987a) ont montré qu'une dose unique d'œstradiol-SLC à des rats mâles castrés provoquait le rétablissement du comportement copulatoire et son maintien pendant 4 semaines.

Chez la femelle, une injection i.v. d'œstradiol-SLC provoque une phase de perte de poids pendant 8 jours suivie d'une phase de prise de poids, supérieure au lot contrôle, pendant 6 jours (Simpkins *et al.*, 1989). Chez des rats femelles ovariectomisés, on observe une perte de poids soutenue qui n'est pas récupérée pendant les 25 jours d'expérience (Estes *et al.*, 1988 ; Simpkins *et al.*, 1989). La phase de prise de poids des femelles intactes est donc ovaires-dépendante et l'observation de leurs ovaires révèle une période de pseudogestation.

En vue de l'application clinique, la pharmacocinétique et la toxicité de l'œstradiol-SLC ont été évaluées chez le rat (Bodor *et al.*, 1987 ; Estes *et al.*, 1991b), le singe (Brewster *et al.*, 1988c) et le chien (Dietzel *et al.*, 1990), ces espèces tolérant bien l'administration répétée de fortes doses. Puis les premiers essais chez l'homme ont été réalisés (Howes *et al.*, 1988 ; Estes *et al.*, 1991a). L'œstradiol-SLC administré en i.v. à des femmes post-ménopausées provoquait une diminution, toutefois non significative, du taux sanguin de LH et de FSH pendant les 8 h suivant l'administration. Cette diminution était dose-dépendante en amplitude et en durée. Elle était d'ailleurs plus longue qu'après une administration d'œstradiol (Howes *et al.*, 1988 ; Estes *et al.*, 1991a).

La progestérone, stéroïde endogène, exerce un certain nombre d'effets physiologiques modulés au niveau central. Comme les autres stéroïdes, la progestérone entre et sort rapidement du SNC. Elle présente ainsi une courte durée d'action au niveau central. Ses actions centrales pourraient pourtant être exploitées, comme par exemple, ses effets sur la LHRH indépendants des manifestations périphériques. Par conséquent, Brewster *et al.* (1990) ont appliqué un SLC à la progestérone ainsi qu'à d'autres cétones α,β-insaturées. Dans le sang humain, le

progestérone-SLC est relativement stable, par contre, il est converti en sel quaternaire dans l'homogénat de cerveau avec un $t_{1/2}$ de 1.7 h. Le sel quaternaire est ensuite hydrolysé rapidement et libère la substance active.

Les progestines, comme l'ethistérone, la norethindrone et le norgestrel, sont des stéroïdes synthétiques qui exercent une activité de type progestérone dans le SNC et à la périphérie. Mais certains de leurs effets périphériques sont indésirables et l'application du principe des SLC aux progestines pourrait être très utile. Brewster *et al.* (1986) ont étudié les cinétiques de distribution d'un norethindrone-SLC et ont mesuré, dans le SNC, des taux de norethindrone plus élevés et plus prolongés qu'après administration de la stéroïde elle-même.

La libération spécifiquement cérébrale de dexaméthasone a été obtenue après administration périphérique d'un dexaméthasone-SLC (Anderson *et al.*, 1989). Ce stéroïde (plus précisément un glucocorticoïde) supprime, chez le rat, la libération d'ACTH et de corticostérone induite par le stress. Mais, le dexaméthasone-SLC maintient cette suppression pendant 5 jours, alors que la dexaméthasone n'est efficace que pendant 24 h. De plus, après administration de dexaméthasone-SLC, les taux sanguin et hépatique de dexaméthasone sont inférieurs à ceux observés après administration de dexaméthasone.

3. SLC appliqués aux agents antiviraux

Les encéphalites virales constituent l'un des problèmes médicaux majeurs dans le monde. Ces maladies sont très difficiles à traiter, en particulier en raison de l'incapacité de nombreux médicaments à pénétrer dans le tissu cérébral. C'est pour cette raison que le principe des SLC a été appliqué aux agents antiviraux, notamment pour le traitement du SIDA et des encéphalites herpétique, japonaise et cytomégalovirale (Brewster *et al.*, 1988d).

a. Agents antirétrovirus

L'azidothymidine (AZT) est l'un des seuls médicaments approuvés pour le traitement du SIDA. Chez quelques patients, ce composé s'est montré efficace pour ralentir l'encéphalopathie associée au SIDA, mais les doses nécessaires provoquent une anémie importante qui oblige, en général, à l'arrêt du traitement, entraînant le retour des symptômes qui avaient diminué (dans Bodor & Brewster, 1991). L'AZT atteint une concentration importante dans le LCR après administration orale ou i.v., mais cette concentration est très supérieure à celle du parenchyme cérébral et des neurones, car l'AZT traverse très peu la BHE. L'approche SLC a donc été appliquée à

l'AZT (Torrence *et al.*, 1988 ; Aggarwal *et al.*, 1990 ; Chu *et al.*, 1990). La distribution d'un AZT-SLC a été évaluée chez le rat et a montré une disparition rapide du complexe lipophile dans le sang ($t_{1/2}$ = 5 mn) alors qu'une concentration élevée du complexe hydrophile dans le cerveau était encore détectable après 4 h. L'AZT était progressivement libéré dans le SNC : il était encore détectable au bout de 120 mn, avec un maximum 30 mn après l'administration. Par rapport à l'administration d'AZT, la concentration cérébrale était ainsi multipliée par trois et la concentration efficace était maintenue deux fois plus longtemps, alors que dans le sang, la demi-vie d'élimination était divisée par quatre (Little *et al.*, 1990). Une distribution spécifiquement cérébrale de l'AZT-SLC a également été observée chez le lapin (Brewster *et al.*, 1991a). L'AZT-SLC a ensuite été évalué chez le chien où l'on observait également des concentrations centrales plus élevées et plus prolongées après administration d'AZT-SLC qu'après administration d'AZT (Little *et al.*, 1990).

b. Agents antiherpétiques

L'acyclovir, un analogue synthétique de la guanine, présente un large spectre d'activité contre le virus simplex de l'herpès et contre le virus zoster de la varicelle. Il est relativement non toxique puisqu'il ne prend sa forme active que dans les cellules infectées par le virus. L'acyclovir a été utilisé de façon limitée dans le traitement de l'encéphalite causée par le virus simplex de l'herpès, en raison de son faible passage à travers la BHE. Venkatraghavan *et al.* (1986) ont donc étudié l'application d'un SLC à l'acyclovir. Après administration i.v. d'acyclovir ou de l'acyclovir-SLC à des rats Sprague Dawley, on observe des résultats très différents : l'injection d'acyclovir ne permet pas de le détecter dans le cerveau et il est éliminé rapidement dans le sang, le foie et les reins (6 h) ; Par contre, après administration de la forme lipophile de l'acyclovir-SLC, on observe des taux prolongés de la forme hydrophile de l'acyclovir-SLC ($t_{1/2}$ = 2 jours) dans le cerveau, et une élimination rapide (< 4 h) dans les tissus périphériques. De plus, la libération d'acyclovir à partir du complexe hydrophile s'effectue d'une manière progressive dans le cerveau ($t_{1/2}$ = 54 h) et est indétectable dans le sang. On ne détecte plus de libération d'acyclovir au bout de 4 h dans les reins, au bout d'1 h dans le foie et les testicules et au bout de 30 mn dans les poumons. Ceci est l'une des meilleures démonstrations de la libération spécifiquement cérébrale d'un composé par un SLC.

La trifluorothymidine est une molécule efficace dans le traitement de l'herpès oculaire. Toutefois, sa toxicité systémique relativement élevée empêche son administration par voie i.v.. Afin de diminuer son profil toxicologique et d'augmenter sa libération dans le SNC, cet agent a été soumis à la méthode des SLC (El-Koussi & Bodor, 1987 ; Rand *et al.*, 1986). L'administration d'une dose de 20 mg/kg de trifluorothymidine-SLC entraîne l'accumulation du complexe oxydé dans le cerveau

de rat. De plus, 18 h après l'administration, on observe une libération de trifluorothymidine dans le SNC, en quantité faible mais mesurable. Par contre, après administration i.v. d'une quantité équivalente de trifluorothymidine, elle n'est pas détectable dans le cerveau, que ce soit 1, 4 ou 18 h après l'administration. Rand *et al.* (1986) ont évalué l'efficacité *in vivo* du trifluorothymidine-SLC chez des rats inoculés par voie intracraniale avec une dose élevée du virus simplex de l'herpès. Ces animaux étaient ensuite traités quotidiennement avec 20 mg/kg de trifluorothymidine-SLC i.v. pendant 5 à 7 jours. Tous les animaux ont développé des signes d'infection du SNC et sont décédés. Mais, l'analyse post-mortem des taux cérébraux de virus a mis en évidence une diminution des taux, n'atteignant toutefois pas un niveau significatif par rapport aux rats non traités. L'expérience a été renouvelée, cette fois avec deux injections de trifluorothymidine-SLC par jour, à la dose de 40 mg/kg. Là encore, aucun rétablissement n'a été constaté, mais les taux de virus étaient significativement diminués par rapport au groupe contrôle. Par conséquent, le SLC permettait le passage de la trifluorothymidine à travers la BHE et sa diffusion dans le parenchyme cérébral. La survie des animaux n'a pas pu être prolongée, peut-être à cause des concentrations virales très élevées employées pour l'inoculation, cependant le traitement a significativement diminué les taux de virus.

c. Agents utilisés dans le traitement de maladies virales "exotiques"

La ribavirine est un agent antiviral très efficace, en particulier pour certains virus à RNA, et son spectre d'activité est assez large. Mais elle est très hydrosoluble, ce qui empêche son utilisation pour les infections cérébrales. Un ribavirine-SLC a été mis au point et testé chez des souris infectées par voie intracraniale avec le virus Japonais encéphalitique (Canonico *et al.*, 1988). Un taux de survie de 40-50% a été obtenu, alors que la ribavirine était totalement inefficace (100% de mortalité). Une série de ribavirine-SLC a également évaluée chez des souris infectées par voie intracraniale avec le virus Punta Toro, responsable notamment de la fièvre phlébotome (Bhagrath *et al.*, 1991 ; Deyrup *et al.*, 1991). Contrairement à la ribavirine qui était sans effet, plusieurs ribavirine-SLC augmentaient le nombre de survivants et la durée moyenne de survie.

4. SLC appliqués aux antibiotiques

Les pénicillines et les céphalosporines sont des antibiotiques de type β-lactamine. Ces antibiotiques sont des molécules polaires et hydrophiles traversant faiblement la BHE, et par conséquent, ils rendent le traitement des différentes infections bactériennes localisées dans le cerveau et le LCR, très difficile. De plus, ils quittent le SNC pour retourner dans le sang, par des mécanismes de transport actif,

ce qui empêche l'utilisation de la méthode des prodrogues pour résoudre le problème de libération cérébrale (dans Wu *et al.*, 1990). Le traitement de maladies graves comme les méningites bactériennes ou les complications neurologiques de la syphilis apparaissant très souvent chez les patients infectés par le HIV, nécessite la mise au point de nouveaux médicaments permettant d'augmenter la pénétration des antibiotiques dans le SNC.

Dans ce but, la méthode des SLC a été appliquée aux benzylpénicillines. Six benzylpénicilline-SLC (de type trigonelline ou quinoléïne) ont été synthétisés. Ils ont été évalués *in vitro* (Pop *et al.*, 1989c) et les quatre composés ayant les propriétés les plus intéressantes ont été testés *in vivo*, chez le rat (Wu *et al.*, 1989) : seuls 2 composés, des benzylpénicilline-SLC de type trigonelline, ont permis d'obtenir des taux d'antibiotiques dans le cerveau, supérieurs à ceux obtenus après administration de benzylpénicilline. De même, chez le lapin et le chien, une libération spécifiquement cérébrale de l'antibiotique a été observée avec ces 2 composés (Wu *et al.*, 1990).

Certaines souches de staphylocoques produisent de la pénicillinase. C'est pourquoi, des pénicillines résistantes à la pénicillinase ont été synthétisées. Malheureusement, elles traversent difficilement la BHE. Pop *et al.* (1989b) ont appliqué la méthode des SLC à ces pénicillines semisynthétiques. Ils ont étudié l'un de ces pénicilline-SLC *in vivo* et ont montré une libération de méthicilline dans le SNC de rat et de lapin après administration i.v. du méthicilline-SLC.

5. SLC appliqués aux agents anti-infectieux

La toxoplasmose est une infection très fréquente, causée par un parasite intracellulaire, généralement bénigne, car elle est bien contrôlée par les lymphocytes T et les macrophages. Mais dans le cas du SIDA, cette partie du système immunitaire est annihilée et la toxoplasmose cérébrale est très souvent mortelle chez ces malades. C'est d'ailleurs l'infection cérébrale la plus fréquente chez les malades du SIDA. Le traitement de la toxoplasmose cérébrale est réalisé avec les sulfonamides. Mais ce traitement s'accompagne de toxicités sévères variées (éruptions cutanées, fièvre, altérations hématopoïétiques) (dans Brewster *et al.*, 1991b). L'utilisation d'un SLC pourrait, par conséquent, améliorer l'index thérapeutique de ces médicaments. Etant donné que les sulfonamides traversent aisément la BHE, le développement de SLC est destiné à accroître leur sélectivité pour le SNC. Des SLC ont été développés pour différentes sulfonamides et ont montré des cinétiques de distribution très intéressantes (Brewster *et al.*, 1991b).

6. SLC appliqués aux agents anticancéreux

L'utilisation de SLC fournit un potentiel très important pour le traitement des tumeurs cérébrales. La plupart des agents anticancéreux administrés par voie systémique se sont avérés efficaces vis-à-vis des tumeurs périphériques, alors qu'il existe très peu d'exemples montrant une activité de ces médicaments contre des tumeurs cérébrales primaires ou contre des tumeurs métastasiques provenant de lignées cellulaires susceptibles à la chimiothérapie en périphérie. Le problème majeur associé au traitement des tumeurs du SNC est la libération du médicament dans la tumeur. Le SLC a donc été appliqué à divers agents antitumoraux comme le chlorambucil (Bodor *et al.*, 1989) et l'hydroxy CCNU (Raghavan *et al.*, 1986, 1987, 1992). Des résultats relativement encourageants ont été obtenus, chez le rat, avec différents SLC transportant des agents anticancéreux, mais les concentrations périphériques restent souvent élevées et peuvent être à l'origine d'effets secondaires indésirables.

7. SLC appliqués aux agents antiépileptiques

0.3 à 0.6% de la population mondiale souffrent de différents types de désordres épileptiques (dans Pop *et al.*, 1991). Les médicaments antiépileptiques peuvent être divisés en 3 classes en fonction de leur site d'action : ils bloquent les crises soit en augmentant l'inactivation des canaux Na^+, soit en augmentant l'inhibition GABAergique, soit en bloquant les courants calciques. La plupart des agents antiépileptiques se distribuent largement et sont par conséquent, assez bien prélevés par le SNC grâce à des caractéristiques physico-chimiques adéquates ou à des mécanismes de transport actif. Après administration, on obtient rapidement un équilibre entre le cerveau et la fraction libre dans le plasma. Toutefois, la concentration cérébrale initialement élevée de ces médicaments chute rapidement parallèlement à la diminution des taux plasmatiques du médicament qui peut passer à une forme liée dans le plasma ou être stocké dans différents tissus. Pour maintenir des concentrations actives dans le SNC pendant une période plus longue, l'administration de doses élevées et/ou répétées de médicament est nécessaire s'accompagnant d'effets secondaires périphériques toxiques. L'application du concept de SLC aux agents antiépileptiques a donc été envisagée pour le GABA (Voir Application des SLC aux neurotransmetteurs), la phénytoïne, le valproate et l'adénosine (Woodard *et al.*, 1990 ; Pop *et al.*, 1991).

La phénytoïne est l'un des composés les plus efficaces et les plus utilisés pour traiter les crises tonico-cloniques généralisées et a été largement évaluée en laboratoire et en clinique (dans Pop *et al.*, 1991). Cet anticonvulsivant présente

toutefois des effets systémiques indésirables, comme par exemple des interactions avec le système immunitaire, des atteintes hépatiques et des éruptions cutanées (Harbaugh, 1989). Après administration i.v., elle diffuse rapidement dans le courant sanguin et se lie fortement (environ 90%) aux protéines plasmatiques, mais la fraction libre diffuse rapidement dans tous les tissus, y compris le SNC et le LCR où elle se lie également aux protéines et aux phospholipides. Dans le cerveau, elle atteint sa concentration maximale en moins de 15 mn, mais celle-ci diminue immédiatement, tout comme les taux plasmatiques. Il faut donc administrer des doses orales répétées pendant 4 à 5 jours ou une dose initiale très élevée pour atteindre un niveau constant. Différents phénytoïne-SLC ont été synthétisés et évalués *in vitro* (Pop *et al.*, 1989a) puis *in vivo* chez le rat (Shek *et al.*, 1989). Des taux relativement élevés de phénytoïne-SLC sous la forme de sel quaternaire ont été observés dans le SNC après administration du complexe lipophile, mais les taux cérébraux de phénytoïne n'étaient pas plus élevés qu'après administration de phénytoïne. Sur le plan pharmacologique, l'un des phénytoïne-SLC testés, un dérivé de dihydropyridine, s'est avéré 7 fois plus efficace que la phénytoïne vis-à-vis des crises toniques induites par le PTZ chez la souris, et 2 fois plus efficace vis-à-vis des MES chez le rat et la souris. De plus, ce composé protégeait les rats et les souris contre les convulsions cloniques induites par le PTZ, alors que la phénytoïne était inefficace. La durée de l'effet protecteur n'était néanmoins pas modifiée par l'application d'un SLC à la phénytoïne. D'autre part, chez la souris, ce phénytoïne-SLC montrait une toxicité neurologique plus importante que la phénytoïne, contrairement à ce qu'on observait chez le rat, où les niveaux de toxicité neurologique étaient équivalents. Des analyses plus détaillées ont montré que le phénytoïne-SLC montrait la même activité anticonvulsivante que la phénytoïne mais avec des taux centraux de phénytoïne moins élevés. En fait, dans les foyers épileptiques, il a été montré que l'activité métabolique oxydative était plus élevée que dans les autres régions du parenchyme cérébral (dans Pop *et al.*, 1991). Ainsi, la transformation du SLC lipophile en sel quaternaire serait plus importante dans les foyers épileptiques et une quantité plus importante de phénytoïne y serait libérée, ce qui conduirait à une activité antiépileptique supérieure pour le phénytoïne-SLC.

L'acide valproïque est une substance anticonvulsivante efficace contre les épilepsies généralisées convulsives ou non convulsives. Après administration i.v. ou i.p., il pénètre rapidement dans le SNC, probablement par un système de transporteurs. Il est ensuite éliminé presque exclusivement par le métabolisme hépatique qui est plus élevé chez les patients épileptiques. En effet, la demi-vie d'élimination de l'acide valproïque n'est que de 5 à 9 h chez ces patients, alors qu'elle est de 12 à 16 h chez les contrôles non épileptiques. Ainsi, des doses plus élevées sont nécessaires pour maintenir les concentrations thérapeutiques de la substance. Mais,

des effets secondaires ont été rapportés avec l'acide valproïque, c'est pourquoi des SLC ont été élaborés et développés pour l'acide valproïque (dans Pop *et al.*, 1991).

L'adénosine est un nucléoside qui module un grand nombre de processus physiologiques. On la retrouve dans la plupart des synapses. Elle inhibe la libération des neurotransmetteurs par une action post-synaptique et diminue l'activité des neurones dans le SNC. Cet effet pourrait être exploité en utilisant l'administration cérébrale d'adénosine pour une action anticonvulsivante ou sédative. Ce nucléoside ne traverse pas très facilement la BHE et est rapidement catabolisé dans le SNC. L'approche SLC a donc été appliquée à cette substance. Les propriétés anticonvulsivantes de différents adénosine-SLC ont été évaluées chez la souris. L'adénosine ou les adénosine-SLC étaient administrés en i.v., 5 mn avant l'application de chocs électroconvulsifs. Aucun des composés ne protégeait les souris contre les convulsions induites électriquement. Par contre, l'un des adénosine-SLC administré en i.p., protégeait les souris contre les crises et la mort induites par le N-méthyl-D-aspartate (NMDA) (dans Pop *et al.*, 1991).

8. SLC appliqués aux antidépresseurs

Le seul exemple d'application de SLC aux antidépresseurs est le désipramine-SLC (Pop *et al.*, 1989d). Cet antidépresseur tricyclique est très peu lipophile et traverse difficilement la BHE. L'efficacité pharmacologique de trois désipramine-SLC a été évaluée à l'aide d'un test de nage forcée ("behavioral despair test") : les souris sont contraintes à nager dans des cylindres étroits pendant 6 mn et la durée totale d'immobilité est mesurée pendant les 4 dernières mn du test. Parmi les 3 SLC testés, l'un d'eux a provoqué une diminution significative du temps d'immobilité, indiquant une activité antidépressive (Pop *et al.*, 1989d).

9. SLC dirigés vers d'autres organes

Le principe des SLC a, par ailleurs, été appliqué à la libération spécifique de substances actives dans l'oeil, notamment d'agents antiglaucome (Bodor & El-Koussi, 1988, 1992), comme par exemple l'adrénaline (Bodor & Visor, 1984a) ou le propanolol (Bodor *et al.*, 1988 ; El-Koussi & Bodor, 1989 ; Bodor & Prokai, 1990) dans les corps ciliaires, ou encore d'agents mydriatiques (Bodor & Visor, 1984b). Dans ce cas, la libération des substances actives spécifiquement dans l'oeil permet de limiter les taux sanguins de ces substances, ce qui diminue les risques d'apparition d'effets secondaires systémiques indésirables. En effet, des effets secondaires graves ont été observés, même après administration oculaire de la substance seule, en raison d'une

forte absorption systémique. Cette méthode permet également de réduire la quantité administrée, puisque ces produits sont plus efficaces que les substances seules.

D'autre part, une méthode de libération colon-spécifique a été proposée, basée sur le système glycoside/glycosidase (Friend & Chang, 1984, 1985). Elle pourrait permettre, en particulier, de traiter les inflammations intestinales en limitant les effets secondaires et en augmentant la réponse pharmacologique. En effet, après administration orale, les substances actives sont souvent absorbées dans l'intestin grêle et n'atteignent pas le colon. Trop peu de résultats sont disponibles pour l'instant pour connaître l'efficacité de cette méthode.

D. Inconvénients de la méthode des SLC

Bien que cette méthode soit avantageuse par rapport à l'administration systémique des substances actives, elle aboutit à une libération dans l'ensemble du cerveau qui n'est pas toujours souhaitable. En effet, alors que la maladie d'Alzheimer semble impliquer un grand nombre de structures cérébrales dispersées, de nombreuses maladies neurologiques, telles que les tumeurs cérébrales et le parkinsonisme, nécessitent une libération locale de substance active, dans une zone bien délimitée du SNC.

Par ailleurs, les transporteurs les plus fréquemment utilisés dans la littérature (trigonellines) s'avèrent très instables et difficiles à manipuler (Voir chapitre 2). L'administration de tels SLC par voie orale n'est donc pas envisageable.

V. Objectifs

Nous avons vu que le système GABAergique influençait un grand nombre de comportements et de fonctions physiologiques. En raison des difficultés rencontrées pour le franchissement de la BHE et l'accès au SNC, la littérature concernant les effets des agents GABAergiques comporte de nombreuses contradictions. Les effets sont souvent différents selon l'agent GABAergique et le mode d'administration employés. Pourtant, les applications thérapeutiques des agents GABAergiques sont nombreuses. La mise au point d'une méthode de distribution cérébrale du GABA lui-même ou de substances GABAergiques ayant un site d'action plus spécifique (sous-type de récepteur, recapture, métabolisme, etc...) serait donc extrêmement profitable, à la fois du point de vue clinique et du point de vue fondamental afin d'améliorer nos connaissances sur le fonctionnement et les implications du système GABAergique.

Le principe des SLC a été largement étudié et appliqué à diverses substances. Il serait donc très intéressant de développer cette méthode avec des

composés GABAergiques. Cependant, les SLC proposés dans la littérature sont souvent très instables et contiennent la plupart du temps, le même type de transporteur. Il semblerait qu'en adaptant les caractéristiques du transporteur à la substance active couplée, l'efficacité et la stabilité des SLC puissent être améliorées.

C'est pourquoi nous avons étudié une série de GABA-SLC et de nipécotate-SLC, comportant différents types de transporteurs. Ces SLC ont été abordés sur le plan physico-chimique, comportemental et biochimique :

- Dans un premier temps, ces molécules ont été synthétisées et analysées sur le plan physico-chimique par le Dr. J.M. Linget. Des paramètres physico-chimiques ont ainsi été définis afin de comparer différents transporteurs et de mettre au point des composés stables et actifs par voie orale.
- Afin d'évaluer l'efficacité fonctionnelle de ces molécules, nous avons sélectionné une série de modèles comportementaux que nous avons mis au point avec différents véhicules d'injection destinés à solubiliser les SLC. Puis, les modèles ont été validés avec le DZP, agissant notamment sur le complexe récepteur GABA/BZD. Afin de définir les effets d'une modification du niveau d'activité GABAergique dans ces modèles, nous avons tout d'abord utilisé un inhibiteur de la recapture du GABA capable de traverser la BHE, le SK&F-89976-A. Les modèles ont ensuite été appliqués à l'étude fonctionnelle des SLC.
- Dans un troisième temps, les SLC ont été abordés sur le plan biochimique par une étude des cinétiques de distribution centrale et périphérique des différentes composantes de la molécule de SLC. Le marquage radioactif des SLC prévu initialement n'ayant pas pu être réalisé, notamment pour des raisons financières, des méthodes d'analyse par HPLC ont été mises au point en collaboration avec les Dr. D. Decolin et A. Minn.

Ainsi, l'étude physico-chimique, comportementale et biochimique des SLC appliqués aux agents GABAergiques devrait permettre de mesurer leur efficacité en tant que transporteurs et par conséquent, de définir les critères physico-chimiques permettant d'obtenir une distribution spécifiquement cérébrale se traduisant par des modifications comportementales. Leur efficacité étant vérifiée, les SLC constitueront des outils performants pour l'étude des effets fonctionnels du système GABAergique et des autres systèmes centraux.

CHAPITRE 2

EVALUATION PHYSICO-CHIMIQUE DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE POUR LE GABA ET L'ACIDE NIPECOTIQUE

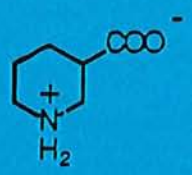
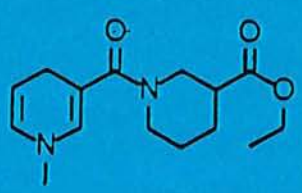
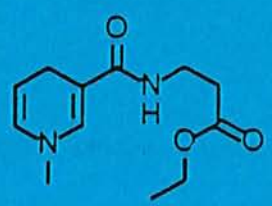
Agent GABAergique	Acide nipécotique 	GABA
Affinité pour les sites $GABA_A$ (CI_{50} de déplacements de [^{3}H] GABA)	>100 µM	0.033
Affinité pour les sites $GABA_B$ (CI_{50} de déplacements de [^{3}H] GABA à saturation d'isoguvacine)	>100 %M	0.03
Inhibition de la recapture du GABA (CI_{50} de déplacements de [^{3}H] GABA)	9 µM	100
Inhibition de la GABA-T (% à 1mM)	-	100
Inhibition de la GAD (% à 1mM)	-	NS
pK	3.9; 10.3	4.0; 10.7
Estimation I/N	250 000	800 000
SLC choisi	**47d** 	**48d** 

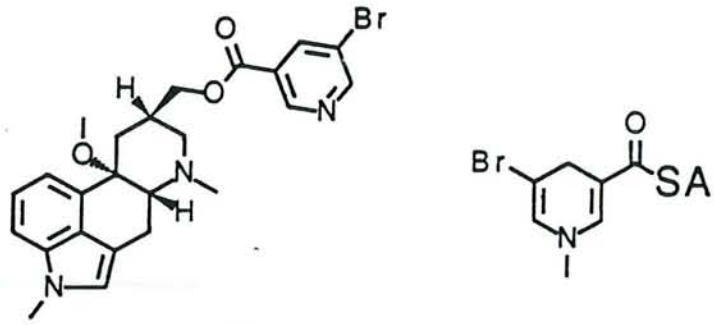
Tableau 12: Nature et activités biochimiques des agents GABAergiques choisis. NS: non significatif à 1 mM; -: pas de valeurs de référence (dans Linget, 1992).

I. Choix de différents transporteurs pour le GABA et l'acide nipécotique

Les composés sélectionnés pour les études comportementales et cinétiques ont été mis au point et synthétisés au Laboratoire de Pharmacochimie Moléculaire de l'Université de Strasbourg 1 par J.M. Linget (Equipe de G. Schlewer). L'objectif des travaux était de mettre au point des protocoles de synthèse de SLC et de sélectionner des paramètres physico-chimiques pour l'évaluation de différents SLC. Cette étude physico-chimique était destinée à permettre une analyse plus précise des résultats déjà publiés sur les SLC et à contribuer à la mise au point de SLC actifs par voie orale notamment.

Le principal transporteur utilisé dans la littérature est la 1,4-dihydrotrigonelline. Le couplage avec la substance active est réalisé, selon le cas, par une liaison ester ou amide en position 3. Bodor & Abdelalim (1985, 1986) ont étudié quelques autres transporteurs fixés sur la position 1.

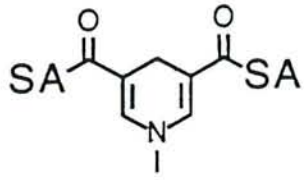
Les premiers transporteurs synthétisés par Linget (1992) pour le GABA étaient également des transporteurs de type dihydrotrigonelline. Afin de permettre un dosage plus aisé de la quantité de substance active libérée sans interférence avec les pools endogènes, un inhibiteur de la recapture du GABA, l'acide nipécotique, a été choisi, en dehors du GABA, pour le couplage avec les transporteurs. Ce composé n'est pas le plus actif dans sa catégorie, mais il est bien adapté à une première approche et paraît moins susceptible aux attaques métaboliques que des composés GABAergiques comme l'isoguvacine et le muscimol. Ainsi, dans un premier temps, un nipécotate-SLC et un GABA-SLC ont été synthétisés, il s'agissait des composés **47d** et **48d** respectivement (Tableau 12). L'agent GABAergique était, dans ce cas, lié au transporteur par sa fonction amine, via une liaison amide, et son carboxyle était protégé par un ester éthylique. Le masquage de la fonction acide permettait d'augmenter la proportion de molécules non ionisées et par conséquent, d'augmenter suffisamment le passage transmembranaire pour que l'activité pharmacologique de ces composés soit détectable. D'autre part, l'amine de l'agent GABAergique était protégée sous forme d'amide, ce qui supprimait l'activité cholinergique de l'ester du composé GABAergique. Etant donné que, chez les rongeurs, les esters sont plus fragiles *in vivo* que les amides, la liaison ester devrait probablement être hydrolysée avant la liaison avec le transporteur, permettant une libération de l'acide (GABA ou nipécotate) plutôt que de l'ester correspondant. Toutefois, les dihydropyridines ainsi obtenues se sont avérées particulièrement sensibles à l'oxydation par l'oxygène de l'air et ce point n'a jamais été mentionné dans les publications concernant les SLC. La valeur thérapeutique de ces systèmes basés sur la dihydrotrigonelline semblait donc hypothéquée.



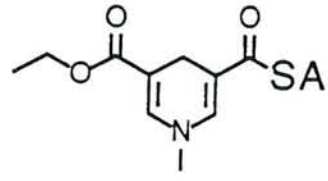
59

60

Figure 39: Structure des SLC dérivés de l'acide 5-bromo nocotinique. SA = Substance Active.

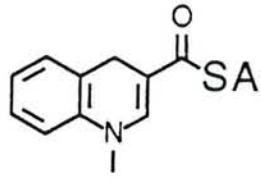


A



B

Figure 40: Structure des SLC dérivés de l'acide 3,5-pyridine dicarboxylique. Les substances actives (SA) peuvent être identiques (**A**) ou différentes (**B**).



63

Figure 41: Structure des SLC dérivés de l'acide quinoléique. SA = Substance Active.

Figure 42: SLC synthétisés (R = éthyle ou benzyle).

Les travaux de Linget se sont donc orientés vers la mise au point de nouveaux transporteurs, actifs par voie orale, manipulables à l'air et utilisables en thérapeutique, mais conservant les caractéristiques des SLC. Pour obtenir des transporteurs moins instables, il faut stabiliser la dihydropyridine. Ceci peut être réalisé en substituant un ou plusieurs groupes attracteurs sur les positions 1, 2, 3, 4 ou 5. Les positions 3 et/ou 5 ont été choisies pour la synthèse des nouveaux transporteurs et 3 types de dérivés ont été envisagés : les dérivés de l'acide 5-bromo nicotinique (Figure 39), les dérivés de l'acide 3,5-pyridine dicarboxylique (permettant, en outre, de coupler 2 molécules de substance active sur un transporteur ; Figure 40) et les dérivés de l'acide 3-quinoléique (Figure 41). Les agents GABAergiques utilisés ont été protégés sous forme d'esters éthylique ou benzylique pour le GABA, et d'ester éthylique pour l'acide nipécotique (Figure 42). Les SLC ont été synthétisés selon une voie identique à celle des composés **47d** et **48d** : formation d'un amide entre la substance active protégée et l'acide de départ, méthylation à l'iodure de méthyle et réduction, généralement par l'hyposulfite de sodium (Figure 43). Exception faite des dérivés de l'acide 5-bromo nicotinique, les dihydropyridines ainsi obtenues se sont avérées généralement plus aisément manipulables que celles dérivées de la trigonelline. Pour les études analytiques et comportementales, ces SLC ont été synthétisés sous les formes réduite et oxydée correspondantes et sous la forme de transporteurs non couplés à la substance active.

II. Caractéristiques chimiques des SLC

Les composés ainsi synthétisés ont été comparés en fonction de différents paramètres physico-chimiques : potentiel d'oxydo-réduction, temps de demi-vie dans un milieu aqueux à pH = 7.4 reflétant l'hydratation du transporteur, formation de pseudobases à pH neutre et coefficients de partage dans les systèmes octanol/tampon phosphate et cyclohexane/tampon phosphate.

A. Potentiels d'oxydo-réduction

Si le transporteur n'est pas oxydé *in vivo*, le complexe transporteur-substance active n'est pas retenu dans le SNC et la libération de la substance active n'est pas spécifiquement cérébrale. Il n'y a pas non plus d'élimination accélérée à la périphérie. L'oxydation du transporteur, à la fois aux niveaux central et périphérique, est donc une phase cruciale pour l'obtention d'un SLC. D'autre part, la mesure des potentiels d'oxydo-réduction des nouveaux SLC permet d'évaluer l'augmentation de stabilité de ces composés.

Les potentiels rédox mesurés sont résumés dans la Figure 44. Plus le potentiel rédox est faible, plus la dihydropyridine sera facilement oxydable et donc

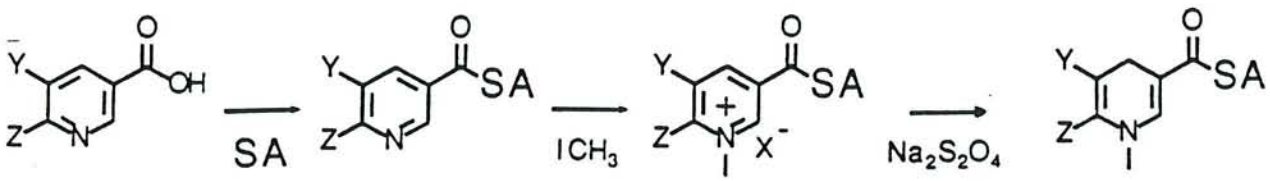
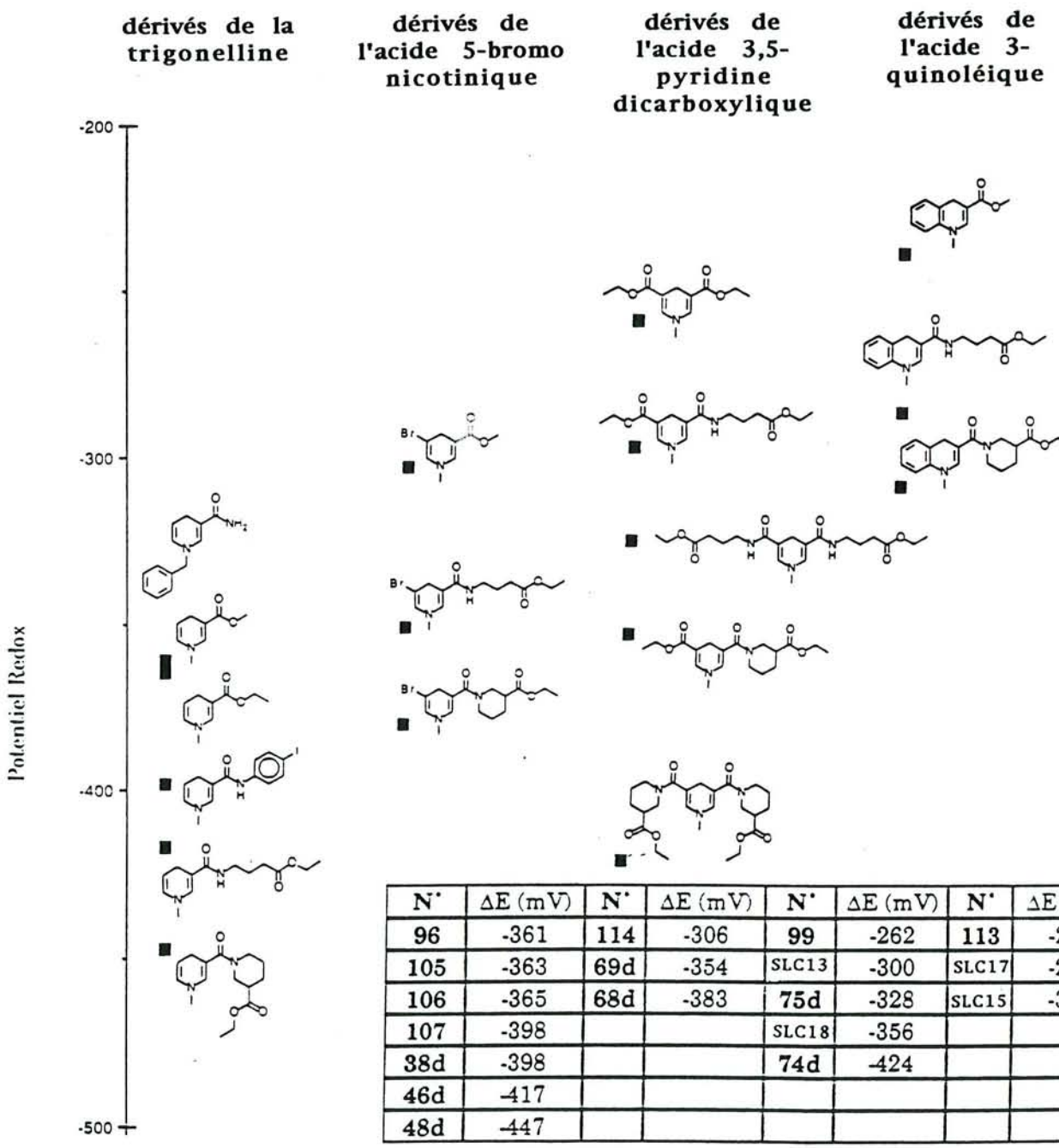


Figure 43: Voie de synthèse des SLC. SA = Substance Active.



N°	ΔE (mV)	N°	ΔE (mV)	N°	ΔE (mV)	N°	ΔE (mV)
96	-361	114	-306	99	-262	113	-241
105	-363	69d	-354	SLC13	-300	SLC17	-289
106	-365	68d	-383	75d	-328	SLC15	-311
107	-398			SLC18	-356		
38d	-398			74d	-424		
46d	-417						
48d	-447						

Figure 44: Potentiels rédox mesurés par la méthode de Kellogg et Piepers. Les valeurs correspondent à la moyenne d'au moins 2 mesures et sont récapitulées dans le tableau (dans Linget, 1992).

instable. On observe que ces potentiels dépendent du transporteur utilisé mais également du mode de liaison entre le transporteur et la substance active couplée. Les dérivés de la trigonelline sont les plus instables, la substitution en 5 augmente la stabilité et les dérivés de la quinoléine sont les plus stables. En ce qui concerne la liaison entre le transporteur et la substance active, on constate que pour chaque transporteur, on retrouve la même séquence de stabilisation, l'ester étant plus stable que l'amide primaire, lui-même plus stable que l'amide secondaire, ce dernier étant plus stable que l'amide tertiaire.

Ces résultats démontrent que la stabilité des SLC peut être augmentée en diminuant la densité électronique des dihydropyridines ou de composés apparentés. De plus, il en découle qu'en fonction de la nature de la substance active à coupler et de son mode de liaison au transporteur, il faudra définir un couple transporteur-substance active optimum, et qu'il n'existe pas un seul transporteur sur lequel toutes les substances pourraient être couplées. Il est à noter que la plupart des travaux publiés sur les SLC concerne les dérivés de la dihydrotrigonelline, qui sont les plus instables des composés étudiés ici.

B. Stabilité des SLC en milieu aqueux

Les dihydropyridines ont tendance à s'hydrater irréversiblement en milieu aqueux. En effet, le temps de demi-vie du SLC14 en milieu aqueux neutre (pH = 7.4) et à 30°C est d'environ 9 mn. La destruction de ce type de dihydropyridine est donc extrêmement rapide, même en milieu neutre. Il est donc intéressant de comparer la stabilité en milieu aqueux des différents types de SLC. Le Tableau 13 résume les résultats obtenus en ce qui concerne le temps de demi-vie à pH = 7.4 ou 2.0 et les potentiels rédox de plusieurs SLC. Les temps de demi-vie s'échelonnent de quelques mn à plus de 20 h. Certains composés, comme le SLC15 (dérivé de l'acide quinoléique) et le SLC13 (dérivé de l'acide 3,5-pyridine dicarboxylique), sont pratiquement stables dans ces conditions. L'hydratation dépend, comme les potentiels rédox, de la nature du transporteur. Par exemple, le SLC14 et le SLC13 transportent tous les deux du GABA et le premier est nettement moins stable que le second. La nature de la liaison substance active-transporteur intervient également. D'autre part, des composés de potentiel rédox proches ont des $t_{1/2}$ d'hydratation très différents, il est donc possible de séparer les phénomènes d'oxydation et d'hydratation.

Les composés pratiquement stables à pH neutre ont été étudiés à pH = 2.0. La stabilité à pH acide est en effet, une donnée intéressante pour la conception de SLC administrables par voie orale. L'acidité du milieu augmente la destruction de la dihydropyridine. Mais, la stabilité à pH = 2.0 des composés les plus stables à pH = 7.4 reste compatible avec une absorption orale.

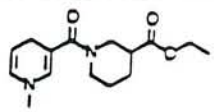
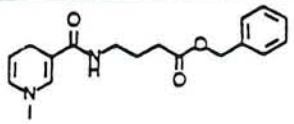
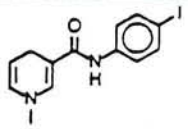
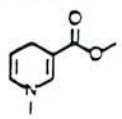
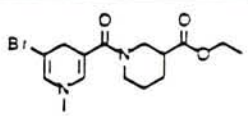
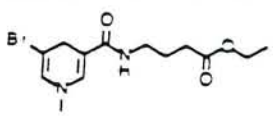
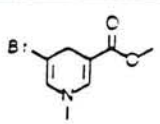
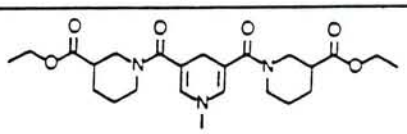
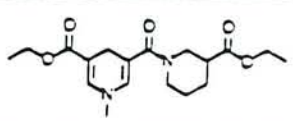
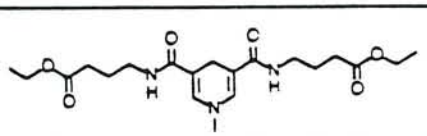
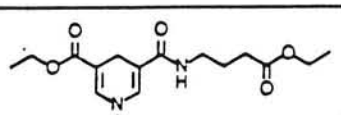
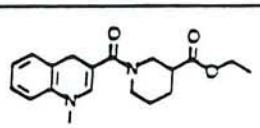
N°	Formule	$t_{1/2}$ pH 7,4 (mn)	Rapport	$t_{1/2}$ pH 2,0 (mn)	Potentiel Redox (mV)
46d		5,0	1		-447
SLC 14		9,2	1,8		-417
38d		44,5	8,9		-398
105		55,2	11		-365
68d		40,5	8,1	0,33	-383
69d		246	51		-354
115		5% en 80*	-		-306
74d		2,5% en 80*	-		-424
SLC 18		0,7% en 240*	-	23% en 30	-356
75d		3% en 240*	-	18% en 30	-328
SLC 13		-	-	stable	-300
SLC 15		0,8% en 240	-	31% en 30	-311

Tableau 13: Comparaison des vitesses d'hydratation des SLC. *: % de la diminution d'absorption de la forme dihydropyridine ou dihydroquinoléine.

C. Formation de pseudobases à pH neutre

Les sels de pyridinium sont susceptibles de former des pseudobases en milieu aqueux. Ce phénomène est très différent de l'hydratation puisqu'il est réversible avec le pH (dans Linget, 1992). D'après les résultats obtenus par Linget, la formation de pseudobases semble peu probable aux pH physiologiques pour les transporteurs étudiés. Seuls les dérivés de l'isoquinoléine seraient susceptibles de former des pseudobases à pH neutre.

D. Coefficients de partage

Plusieurs modèles ont été proposés pour décrire le passage d'un composé vers le cerveau, ils utilisent des coefficients de partage avec différents solvants, en particulier l'octanol. Selon Levin (1980), le franchissement des capillaires cérébraux est corrélé au coefficient de partage octanol/eau et à la masse molaire selon la relation :

$$\log P_c = 4.605 + 0.411 \log((P_{oct}) \times M^{1/2})$$

où P_c est le coefficient de perméabilité des capillaires, P_{oct} le coefficient de partage octanol/eau et M la masse molaire. Hansch *et al.* (1987) considèrent qu'un composé ayant un logP(octanol/eau) compris entre 1.5 et 2.5 pénètre aisément dans le cerveau.

Pour comparer la lipophilie des SLC synthétisés, un autre modèle a été utilisé, proposé par Young *et al.* (1988). D'après les auteurs, le logarithme du rapport des concentrations dans le cerveau et le sang ($\log(C_{cerveau}/C_{sang})$) à l'équilibre est corrélable à une grandeur appelée ΔlogP, définie comme la différence entre les logarithmes des coefficients de partage dans l'octanol (P_{oct}) et dans le cyclohexane (P_{cyc}) :

$$\Delta\log P = \log P_{oct} - \log P_{cyc}$$

La corrélation obtenue s'écrit :

$$\log(C_{cerveau}/C_{sang}) = -0.485\Delta\log P + 0.889$$

les concentrations étant établies à l'équilibre après injection i.v. du composé marqué. Plus le ΔlogP sera faible, c'est-à-dire plus le rapport P_{oct}/P_{cyc} sera petit, meilleur sera le passage vers le cerveau. Pour un ΔlogP d'environ 1.8, les concentrations dans le sang et dans le cerveau seraient égales. D'après Young *et al.*

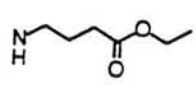
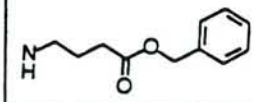
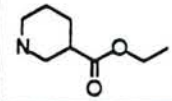
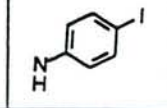
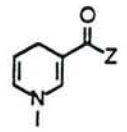
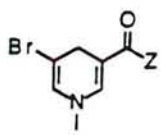
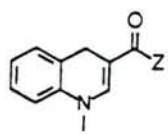
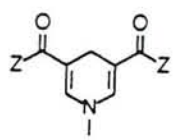
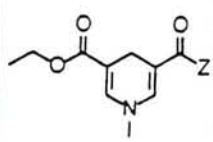
Z transporteur								
	lg P_{oct}	1,77		2,96		1,83		2,97
	lg P_{cyc}	**48d** -2,15	SLC 14	-0,31	**47d**	-1,08	**38d**	1,39
	ΔlgP	**3,92**		**3,27**		**2,91**		**1,58**
	lg P_{oct}	2,63		3,16		2,68		
	lg P_{cyc}	**69d** -0,15	**70d**	0,84	**68d**	0,68		
	ΔlgP	**2,78**		**2,32**		**2,00**		
	lg P_{oct}	2,87		3,55		3,23		
	lg P_{cyc}	SLC 17 -0,03	**73d**	0,82	SLC 15	1,25		
	ΔlgP	**2,90**		**2,73**		**1,98**		
	lg P_{oct}	1,88		3,12		1,96		
	lg P_{cyc}	**75d** -1,57	**76d**	0,07	**74d**	-0,94		
	ΔlgP	**3,45**		**3,05**		**2,90**		
	lg P_{oct}	2,05		3,14		2,16		
	lg P_{cyc}	SLC 13 -0,65	SLC 19	0,35	SLC 18	0,04		
	ΔlgP	**2,70**		**2,79**		**2,12**		

Tableau 14: Mesures des coefficients de partage en fonction du transporteur et de la substance active couplée (Z) (moyenne d'au moins 2 mesures).

(1988), P_{oct} représenterait plutôt la fixation aux protéines plasmatiques, alors que P_{cyc} pourrait refléter les processus de partage vers le cerveau. Le passage vers le SNC serait la résultante de ces deux phénomènes.

Les mesures de coefficients de partage dans l'octanol et le cyclohexane obtenues avec les SLC sont récapitulées dans le Tableau 14 et la Figure 45 représente les mesures de ΔlogP. On remarque que pour des composés ayant des P_{oct} proches, les P_{cyc} peuvent être très différents et inversement. Par conséquent, des composés ayant des coefficients de partage très différents peuvent avoir le même ΔlogP et donc, avoir un rapport de concentration cerveau/sang identique.

Pour une même substance active couplée, les SLC sont plus ou moins favorables : les SLC dérivés de l'acide nicotinique ou de l'acide 3,5-pyridine dicarboxylique sont les plus défavorables. Par contre, les dérivés de l'acide 3-quinoléique et de l'acide 5-bromo nicotinique sont nettement plus favorables.

Pour un transporteur donné, le dérivé du nipécotate possède un meilleur ΔlogP que les dérivés du GABA. De plus, le dérivé de l'ester benzylique du GABA possède généralement un ΔlogP plus favorable que celui de l'ester éthylique du GABA. Le composé 38d, un dérivé de la *p*-iodoaniline, est le seul composé étudié pour lequel la concentration cérébrale serait supérieure à la concentration sanguine, puisque le ΔlogP est inférieur à 1.8.

Le ΔlogP dépend plus de la substance couplée que du transporteur, étant donné que les valeurs les plus élevées et les plus basses ont été obtenues avec un même transporteur, la dihydrotrigonelline. Ce transporteur, le plus décrit dans la littérature, apparait comme l'un des moins favorables, à substance couplée égale.

Cette étude du ΔlogP a permis d'obtenir des informations sur le passage des membranes biologiques par les composés, mais également sur la fixation aux protéines plasmatiques. Au vu de ces résultats et d'après Hansch *et al.* (1987), il semble préférable, à ΔlogP proche, de privilégier les SLC ayant les coefficients de partage les plus faibles, c'est-à-dire des P_{oct} compris entre 1.5 et 2.5.

E. Utilisation des caractéristiques physico-chimiques dans l'analyse des SLC

Les études biochimiques concernant les SLC sont nombreuses mais malheureusement difficilement comparables. Même pour les publications d'une seule équipe, les conditions d'obtention sont différentes, jusqu'aux compositions et méthodes de préparation des homogénats qui sont extrêmement variables. Les méthodes d'analyse sont également très variées (spectroscopie UV, HPLC). Il est donc assez difficile de savoir si les mesures physico-chimiques reflètent les résultats publiés d'études *in vitro* et *in vivo*.

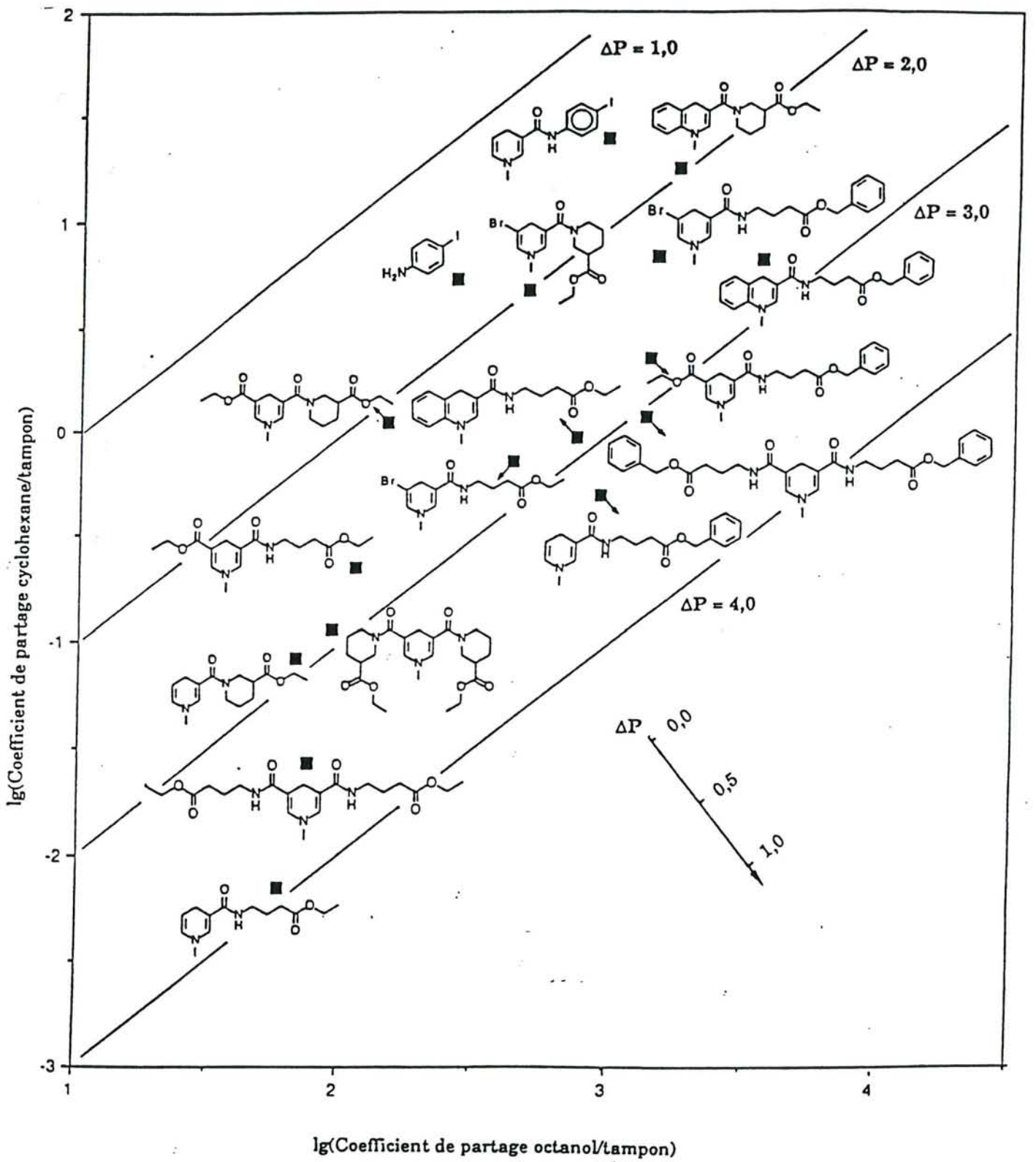


Figure 45: Représentation des mesures de ΔlogP (ΔP). Le P_{oct} figure en abscisse, le P_{cyc} en ordonnée et le ΔlogP sur la diagonale. Les ΔlogP les plus favorables sont situés en haut et à gauche de la figure.

Les principaux résultats biochimiques d'études sur des milieux biologiques décrits dans la littérature sont résumés dans le Tableau 15. Les demi-vies des SLC dans le plasma humain sont plus élevées que ne le laissaient prévoir les études de stabilité en milieu aqueux. Il est donc possible que la dihydropyridine soit stabilisée dans les milieux biologiques. Par ailleurs, il semble que, dans les milieux biologiques, les SLC dont la substance active est liée par une liaison ester soient plus stables qu'un SLC substitué par une liaison amide, et ceci confirme les résultats de l'étude des potentiels d'oxydo-réduction et des temps de demi-vie d'hydratation.

Les paramètres choisis par Linget dans cette étude physico-chimique ont donc permis de rationaliser la conception de SLC de type dihydropyridine ou apparenté, et d'analyser plus profondément les données publiées. Cette étude a mis en évidence l'importance de la substance active couplée dans toutes les propriétés physico-chimiques des SLC. Cet aspect est nouveau car jusqu'à présent, le transporteur et la substance couplée étaient plutôt considérés comme deux entités indépendantes.

En ce qui concerne les composés qui seront évalués dans l'étude comportementale, les paramètres physico-chimiques mesurés par Linget sont récapitulés dans le Tableau 16. Ils nous permettront, ultérieurement, de faire le parallèle entre ces résultats physico-chimiques et les résultats comportementaux.

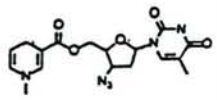
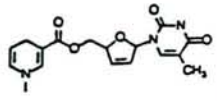
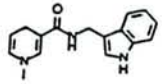
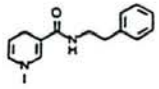
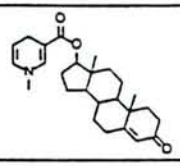
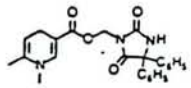
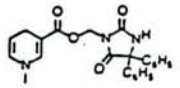
N°	Composé	Méthode	Plasma	Sang complet	Homogénat de cerveau	Références
125		HPLC	Humain (50%) 462		Souris (10%) 10.2	Chu *et al.*, 1990
126		UV	Humain (50%) 325		Souris (40%) 130	Palomino *et al.*, 1989
42		UV	Humain (20%) 64.2	Humain 13.7	Rat (2%) 28.2	Bodor *et al.*, 1986
36		UV	Humain (80%) 82.6	Humain 8.4	Rat (10%) 13.7	Bodor & Farag, 1983a
127		UV	Humain (80%) 142	Humain 66	Rat (20%) 67	Bodor & Farag, 1984
128		HPLC	Rat (10%) 13.9 Rat (20%) 15.7	Rat (10%) 10.2 Rat (20%) 8.8	Rat (10%) 4.0 Rat (20%) 4.9	Pop *et al.*, 1991
129		HPLC	Rat (10%) TS Rat (20%) 72.0	Rat (10%) TS Rat (20%) -	Rat (10%) TS Rat (20%) 21.8	Pop *et al.*, 1991

Tableau 15: $t_{1/2}$ de disparition des formes réduites des SLC dans les milieux biologiques exprimés en mn. TS = "trop stable pour être mesuré".

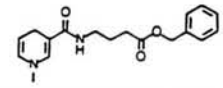
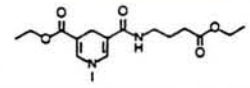
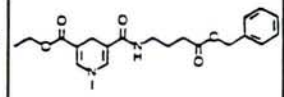
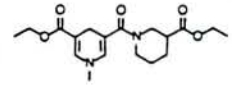
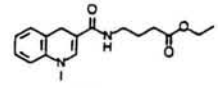
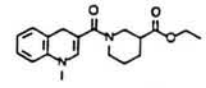
N°	Composé	ΔE	Hydra-tation pH 7.4	Hydra-tation pH 2.0	log P_{cyc}	log P_{oct}	ΔlogP	DME
SLC 14		-417	9 mn	-	-0.31	3.27	2.96	>20
SLC 13		-300	-	stable	-0.65	2.70	2.05	2.5
SLC 19		-	-	-	0.35	3.14	2.79	>20
SLC 18		-356	0.7% en 4 h	23% en 30 mn	0.04	2.12	2.16	>20
SLC 17		-289	-	-	-0.03	2.90	2.87	>20
SLC 15		-311	0.8% en 4 h	31% en 30 mn	1.25	1.98	3.23	>20

Tableau 16: Récapitulation des propriétés physico-chimiques et anxiolytiques des composés évalués dans l'étude comportementale. DME = Dose minimale efficace dans le test de l'escalier exprimée en mg/kg; - = non mesuré.

CHAPITRE 3

ETUDE COMPORTEMENTALE : PRESENTATION DES TESTS ET MATERIEL ET METHODES GENERAL

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON

A. Présentation du test

Inspirée du test mis au point par Poschel (1971), cette procédure simple permet d'évaluer rapidement les propriétés anxiolytiques d'un grand nombre de composés. Elle est basée sur le fait que, sous l'influence des BZD, des rats non affamés et non assoiffés augmentent fortement leur consommation d'un liquide étranger mais très palatable (lait concentré sucré) par rapport à des rats témoins, lors de la première présentation de cette boisson. Parmi les substances testées par Poschel (1971) en dehors des BZD (exemple : méprobamate, imipramine, diphénylhydantoïne, amitriptyline, phénobarbital, etc...), un effet similaire, cependant nettement moins marqué que celui des BZD, a été observé uniquement avec le phénobarbital (Tableau 17). Ces résultats sont interprétés par Poschel (1971) en termes de désinhibition, par les BZD en particulier, de l'aversion naturelle du rat pour un aliment non familier, ne s'accompagnant pas d'une activité sédative notable. Malick & Enna (1979) ont confirmé les résultats de Poschel avec des benzodiazépines et d'autres substances (Tableau 18). En outre, Hodges *et al.* (1981) ont montré que la boisson inconnue devait obligatoirement être sucrée pour que le test soit valable. A l'inverse des BZD, la picrotoxine inhibe l'ingestion de lait chez des rats mis en contact pour la seconde fois avec cette boisson (Soubrié *et al.*, 1979). Toutefois, il est à noter que lors du premier contact, la picrotoxine ne réduit pas l'ingestion de lait, déjà très faible.

Cette procédure est très intéressante car elle permet d'évaluer une activité désinhibitrice à l'aide d'animaux non assoiffés et non affamés, sans conditionnement ou entraînement préalable, et sans suppression comportementale induite par des chocs électriques aversifs, ce qui limite les manipulations préliminaires des animaux et notamment, les interférences avec une éventuelle activité antinociceptive.

Nous avons appliqué ce test au DZP et au SK&F-89976-A, en solution dans différents véhicules chez le rat mâle Wistar. De plus, afin d'effectuer une comparaison inter-souche, nous avons étudié l'effet du DZP dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, chez le rat mâle Long-Evans.

B. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar ou Long-Evans provenant, selon l'expérience, soit de centres d'élevage (IFFA-CREDO ou Janvier respectivement), soit

Drug	Dose (mg/kg)								
	0.625	1.25	2.5	5	10	20	40	80	160
Nitrazepam	6.4	9.5	8.6	12.0	11.6	16.3	3.4		
Diazepam	2.9	5.2	8.0	7.1	7.4	12.1	10.7		
Chlordiazepoxide			3.9	4.7	8.1	11.4	10.7		
Oxazepam			5.8	4.6	9.2	10.5	8.8		
Medazepam	5.2	6.4	8.0	9.1	6.9	8.2	4.0		
Phenobarbital				5.1	6.0	7.4	7.2	5.9	6.9
Chlorpromazine		3.6	5.4	4.6	2.9				
Pentobarbital				3.5	5.4	3.6			
Meprobamate						4.7	5.2	3.6	2.4
Fenimide				3.1	3.9	4.7	4.9	3.7	
Amitriptyline			2.2	4.8	2.4				
Diphenylhydantoin				2.8	4.8	1.9	1.8		
Ethosuximide				3.4	4.5	4.1	3.6		
Thiamylal					4.4	3.9	4.3	3.4	
Molindone		1.6	3.9	3.8	0.0				
Tetrabenazine		3.4	3.8	0.4	0.0				
Ectylurea							2.6	1.4	3.8
Imipramine				3.4	3.3	0.8			
Trimethadione						2.7	3.3	2.4	

Tableau 17: Effet de différentes substances dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson: Ingestion moyenne de lait (ml) en une h (dans Poschel, 1971).

Drug	MED[a] (mg/kg, p.o.) for disinhibition
Benzodiazepines	
Clonazepam	1
Flurazepam	3
Nitrazepam	6
Diazepam	10
Halazepam	10
Desmethylchlordiazepoxide	10
Flunitrazepam	17
Oxazepam	17
Bromazepam	17
Chlordiazepoxide	20
Ripazepam	60
Chlorazepate	60
Medazapam	60
Nonbenzodiazepines	
Zopiclone	3
CL 218,872	10
Tracazolate	200
Meprobamate	300
Phenobarbital	>177
Pentobarbital	>100

[a]Minimal effective dose for significant disinhibition.

Tableau 18: Effet de différentes substances anxiolytiques dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson chez le rat (dans Patel & Malick, 1983).

de l'élevage du laboratoire. A leur arrivée dans la salle d'expérimentation, les rats sont répartis au hasard dans des cages de 4 à 6 individus selon leur poids. Ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le cycle d'éclairement est de 12-12 h, la phase d'obscurité se situant entre 9 h et 21 h. La naïveté vis-à-vis de la boisson étant requise, chaque animal n'est utilisé qu'une seule fois dans cette procédure.

C. Dispositif expérimental

Le test est effectué dans des cages grillagées (30 x 40 x 20 cm) auxquelles est adapté un biberon. Ce biberon est constitué d'une éprouvette graduée de 100 ml, fermée par un bouchon en caoutchouc traversé par un tube en métal contenant une bille l'empêchant de couler. La hauteur entre l'orifice du biberon et le plancher de la cage est fixée à 3 cm. 8 cages individuelles sont utilisées simultanément. Ainsi, 4 traitements différents peuvent être évalués par session, 2 rats étant assignés à chaque traitement. L'ordre de répartition des traitements dans les cages est modifié d'une session à l'autre, afin d'éliminer les éventuelles incidences des cages (position de la cage sur le portoir, etc...). La boisson, du lait concentré sucré NESTLE® dilué à 20% dans l'eau, est préparée le jour de l'expérience.

D. Traitements

Les substances testées (DZP et SK&F-89976-A) sont administrées par voie i.p., en solution dans différents véhicules : l'éthanol ou le diméthylisosorbide éther (DMI) pour le DZP ; l'éthanol, le DMI ou le NaCl 9‰ pour le SK&F-89976-A. Toutes les solutions sont préparées de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel. Un lot contrôle (témoin dans le cas du NaCl 9‰), traité avec le véhicule seul, est constitué à chaque expérience.

E. Procédure

Les expérimentations sont effectuées dans la salle d'élevage des animaux pendant la période d'obscurité, en lumière rouge. Immédiatement après le traitement, le rat est introduit dans la cage d'expérimentation. 30 mn plus tard, un biberon contenant la solution de lait sucré, est adapté à la cage et maintenu pendant 1 h.

F. Paramètres observés

Le taux de boisson en ml est relevé toutes les 15 mn pendant 1 h.

Drug	MED (mg/kg, p.o.) for antagonism of pentylene-tetrazol-induced convulsions
Flunitrazepam	0.03
Clonazepam	0.25
Bromazepam	0.25
Diazepam	0.8
Chlorazepate	1.0
Nitrazepam	1.0
Oxazepam	1.3
Flurazepam	2.5
Chlordiazepoxide	2.5
Medazepam	4.0
Halazepam	8.0
Desmethylchlordiazepoxide	10.0
Ripazepam	15.0
Phenobarbital	20.0
Meprobamate	200.0

Tableau 19: Antagonisme des convulsions induites par le PTZ (82 mg/kg s.c.) chez la souris par différentes substances anxiolytiques (dans Patel & Malick, 1983).

Action within GABA synapses	Activity in animal models	Clinical activity
	Agents that diminish GABA synaptic activity	
L-Glutamic acid decarboxylase inhibitors	Convulsant	Proconvulsant/convulsant (cycloserine)
$GABA_A$ antagonists	Convulsant	Untested
Reduced chloride ion entry	Convulsant	Untested
	Agents that enhance GABA synaptic activity	
GABA-transaminase inhibitors	Broad anticonvulsant spectrum	Antiepileptic (valproate, γ-vinyl GABA)
GABA uptake inhibitors	Anticonvulsant	Untested
GABA agonists: $GABA_{A+B}$	Broad anticonvulsant spectrum	Antiepileptic (progabide)
$GABA_A$	Wide anticonvulsant spectrum (inactive strychnine, electroshock, *Papio papio*)	Limited activity (THIP)
$GABA_B$	Limited anticonvulsant spectrum (pentetrazole, strychnine, audiogenic DBA_2 mice)	Not useful as an epileptic (baclofen)

Tableau 20: Activité anticonvulsivante de diverses substances GABAergiques en fonction de leur mode d'action (dans Lloyd & Morselli, 1987).

G. Analyse statistique

Etant donné qu'il s'agit de lots non appariés, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour l'ensemble des lots puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Mann-Whitney pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%. Dans le cas où l'expérience ne comprend que 2 lots, seul le test de Mann-Whitney est employé.

Nous utilisons des tests non paramétriques parce que le caractère gaussien des distributions n'est pas démontré.

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ

A. Présentation du test

Le test d'inhibition des convulsions induites par le PTZ, chez le rat ou la souris, fait partie des modèles animaux connus pour être indicatifs de l'efficacité anticonvulsivante chez l'Homme, tout comme l'inhibition des MES. Par ailleurs, il a été montré que le rat était une espèce plus intéressante que la souris pour tester les effets de composés anticonvulsivants. Ce test est l'un des plus fréquemment employés pour le screening des composés anticonvulsivants et a été largement employé pour déterminer l'activité anticonvulsivante de substances diverses telles que :

- des 1,4-BZD (Swinyard & Castellion, 1966 ; Malick & Enna, 1979 ; Niemegeers & Lewi, 1979 ; Patel & Malick, 1983 ; Skolnick *et al.*, 1983 ; Pellow, 1985 ; File *et al.*, 1985, 1989 ; Keane *et al.*, 1988) qui sont généralement très efficaces (Tableau 19) ;
- une 3,4-BZD, le tofisopam, qui n'a pas d'effet anticonvulsivant significatif (Pellow & File, 1986b) ;
- des ligands du récepteur BZD (Jensen & Petersen, 1983 ; Oakley *et al.*, 1984) : les agonistes augmentent le seuil d'apparition des convulsions et les agonistes inverses le diminuent, alors que les antagonistes n'ont pas d'effet significatif ;
- des dérivés quinoline qui se lient au récepteur BZD et montrent des propriétés anxiolytiques mais sont dépourvus d'activité anticonvulsivante (Le Fur *et al.*, 1981) ;
- des dérivés pyrrolo(1,4)BZD (Wright *et al.*, 1978) dont certains sont anticonvulsivants ;
- des barbituriques et de nouveaux composés anxiolytiques (Pellow, 1985) offrant des résultats variables ;
- l'abécarnil, une β-carboline ayant des propriétés anticonvulsivantes(Turski *et al.*, 1990) ;

- le GR38032F, antagoniste du récepteur 5-HT_3 (Jones *et al.*, 1988) qui serait un agent anxiolytique puissant, dépourvu d'activité sédative, anticonvulsivante ou hypnotique ;
- la diphénylhydantoïne (Doteuchi & Costa, 1973) qui a une structure moléculaire proche du DZP mais n'antagonise pas les crises induites par le PTZ ;
- la 6-hydroxydopamine (Oishi *et al.*, 1979) qui affecte le système noradrénergique et réduit le seuil d'apparition des convulsions induites par le PTZ ;
- des xanthines : la théophylline et la caféine sont proconvulsivantes, alors que l'enprofylline et l'isbufylline, deux nouvelles xanthines sont dépourvues d'activité proconvulsivante (Cutrufo et al., 1992) ;
- et certaines substances GABAergiques : l'acide aminooxyacétique, l'hydrazine et l'hydroxylamine augmentent le taux de GABA cérébral et possèdent tous les trois une activité anticonvulsivante, mais à des degrés différents (Wood & Peesker, 1975). Ils sont d'ailleurs efficaces vis-à-vis de convulsivants agissant au niveau du système GABAergique ou au niveau d'autres systèmes. Par contre, le γ-acétylénique-GABA augmente les concentrations en GABA dans le SNC et protège les souris contre les crises induites par des stimuli audiogènes, par électrochoc, par le thiosemicarbazide, l'isoniazide (deux inhibiteurs de la GAD) ou la strychnine (bloque les récepteurs glycine), mais est inefficace contre les convulsions induites par le PTZ (Schechter *et al.*, 1977). Löscher (1982) a évalué les propriétés anticonvulsivantes de 16 substances GABAmimétiques. Toutes ces substances augmentaient significativement le seuil d'apparition des convulsions induites soit par des électrochocs, soit par le PTZ, les plus efficaces étant le muscimol, le THIP et les moins efficaces, le γ-vinyl GABA et l'éthanolamine-O-sulfate. De même, Matthews & McCafferty (1979) ont montré que le muscimol possédait une activité anticonvulsivante vis-à-vis des crises induites par le PTZ, l'isoniazide et la bicuculline (antagoniste du site récepteur GABA). Par contre, il retardait l'apparition des crises induites par la picrotoxine (se fixe sur l'ionophore Cl^-) sans les atténuer et n'avait aucun effet sur les crises induites par la strychnine. Les antidépresseurs tricycliques sont proconvulsivants chez l'homme et l'animal. Or, la fengabine, un nouvel antidépresseur atypique, montre un spectre d'activité anticonvulsivante similaire à celui du progabide et du valproate, il est d'ailleurs généralement plus efficace que ces derniers (Lloyd *et al.*, 1987) et on pense que la fengabine agirait au niveau du système GABAergique. Enfin, les inhibiteurs de la recapture du GABA présentent eux aussi, une activité anticonvulsivante (Croucher *et al.*, 1983 ; Yunger *et al.*, 1984). Le SK&F-89976-A et le SK&F-100330-A, représentant une nouvelle classe d'inhibiteurs de la recapture du GABA actifs par voie orale, protègent contre la composante "extension des pattes antérieures" des crises induites par l'administration i.v. de bicuculline ou de PTZ chez le rat et la souris et des MES chez le rat (Yunger *et al.*, 1984). Par contre, ils sont inefficaces

vis-à-vis des crises induites par la strychnine chez le rat et vis-à-vis des MES chez la souris (Yunger *et al.*, 1984). Le THPO, inhibiteur de la recapture gliale du GABA, protège les souris contre les convulsions induites par le PTZ lorsqu'il est administré par voie i.p., mais curieusement, il est inefficace par voie i.c.v. (Croucher *et al.*, 1983). Le nipécotate est inefficace par voie i.c.v. (Croucher *et al.*, 1983). Il semblerait que les inhibiteurs de la recapture du GABA aient des propriétés antiépileptiques plus importantes que les agonistes GABA (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1987). Les activités anticonvulsivantes de diverses substances GABAergiques, dans des modèles animaux et en clinique, sont résumées dans le Tableau 20.

En fonction de ces données, il nous a semblé intéressant d'étudier les effets anticonvulsivants de substances agissant au niveau du système GABAergique.

Dans la procédure que nous avons utilisée, les convulsions étaient provoquées chez le rat, par une injection i.p. de PTZ à 60 mg/kg. Dans un premier temps, nous avons vérifié, dans ce protocole, l'efficacité du DZP, dissous dans l'éthanol ou le DMI. En clinique, l'activité anticonvulsivante du DZP a déjà été démontrée, et il faut noter que cette BZD arrête le status epilepticus mais qu'elle est également efficace contre les crises d'absence et les crises cloniques.

Une deuxième stratégie a été employée pour augmenter l'activité synaptique GABAergique : le blocage de la recapture du GABA dans les neurones et les cellules gliales, par le SK&F-89976-A (acide nipécotique modifié). En effet, des études pharmacologiques ont montré une activité anticonvulsivante de cette molécule dans différents modèles de rats, et ce composé a probablement une activité anticonvulsivante importante du point de vue clinique (Yunger *et al.*, 1984).

B. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar ou Long-Evans provenant soit de centres d'élevage (IFFA-CREDO ou Janvier respectivement), soit de l'élevage du laboratoire. A leur arrivée dans la salle d'expérimentation, les rats sont répartis au hasard dans des cages de 4 à 6 individus selon leur poids. Ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le cycle d'éclairement est de 12-12 h, la phase d'obscurité se situant entre 9 h et 21 h. La naïveté vis-à-vis du test n'étant pas requise, le même animal pourra être utilisé plusieurs fois dans certaines expériences.

C. Dispositif expérimental

Pour éviter qu'il ne se blesse pendant la crise comportementale et pour faciliter l'observation du déroulement de la crise, l'animal est placé dans une

enceinte circulaire en ALTUGLAS® transparent de 50 cm de diamètre et 35 cm de hauteur.

D. Traitements

Les substances testées pour leur activité anticonvulsivante (DZP et SK&F-89976-A) sont administrées par voie i.p. sous forme de solutions dans différents véhicules (éthanol ou DMI). Toutes les solutions sont préparées de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel.

30 ou 60 mn après l'administration de la substance testée, le convulsivant (PTZ) est injecté par voie i.p. à la dose de 40, 45 ou 60 mg/kg selon l'expérience. Il est dissous dans une solution de NaCl 9‰ de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel.

Dans la plupart des expériences, les sessions de contrôle sont réalisées avec les mêmes animaux, 48 h avant les sessions avec les substances. Lors des sessions de contrôle, les rats reçoivent une administration i.p. du véhicule seul (2 ml/kg) suivie 30 ou 60 mn plus tard, d'une administration i.p. de PTZ.

E. Procédure

Les expérimentations sont effectuées dans la salle d'élevage des animaux pendant la période d'obscurité. En effet, des variations de sensibilité au PTZ ont été observées au cours du cycle de 24 h, la sensibilité étant maximale 4 h après le début de la période d'obscurité (Eidman *et al.*, 1990).

Après l'administration de la substance testée, l'animal est remis dans sa cage d'habitation. 30 (ou 60) mn plus tard, la substance convulsivante est administrée. Le rat est alors introduit immédiatement dans l'enceinte transparente, et le déroulement de la crise comportementale est observé pendant une durée minimale de 30 mn.

Dans la plupart des expériences, en raison de la grande variabilité inter-individuelle, le même groupe de rats est testé plusieurs fois, mais avec différents traitements. Ce type de démarche existe dans la littérature (Schwark & Löscher, 1985) et un rat peut subir plusieurs fois ce test sans inconvénient majeur. Ceci permet d'éliminer la variabilité inter-individuelle puisqu'elle reste constante au cours de l'expérience. Le deuxième avantage de cette méthodologie est que les comparaisons statistiques peuvent être effectuées en procédure appariée, ce qui augmente la puissance du test.

Les sessions de contrôle (véhicule seul puis PTZ) sont donc effectuées en alternance avec les sessions avec les substances, 2 sessions successives étant séparées d'au moins 48 h. Ainsi, pour chaque animal, les injections successives des substances

testées sont séparées d'au moins 4 jours, afin de permettre l'élimination des composés administrés et d'éviter les interférences d'une session à l'autre en cas d'effets longue durée.

F. Paramètres observés

1. Sévérité de la crise comportementale

La sévérité de la crise est évaluée selon l'échelle de Racine (1972) :

- **STADE 0 :** Aucune réponse comportementale visible à l'injection de PTZ.
- **STADE 1 :** Immobilité augmentée.
- **STADE 2 :** Balancement de la tête et/ou mouvements cloniques de la mâchoire et mouvements faciaux.
- **STADE 3 :** STADE 2 + redressement sur les pattes postérieures.
- **STADE 4 :** STADE 3 + mouvements cloniques des pattes antérieures.
- **STADE 5 :** Crise motrice complète, c'est-à-dire redressement sur les pattes postérieures, clonus des pattes antérieures et clonus facial, clonus des pattes postérieures, perte de l'équilibre et chute sur le plancher de la cage.

2. Latence d'apparition de la crise

La latence d'apparition de la crise est exprimée en s. et correspond à l'intervalle de temps entre l'injection de PTZ et le premier signe d'activité de crise comportementale, habituellement la fermeture des yeux.

3. Durée de la crise

La durée de la crise est exprimée en s. et correspond à l'intervalle de temps entre l'injection de PTZ et la disparition de tous les signes comportementaux d'activité de crise.

4. Taux de mortalité

Le nombre d'animaux décédés est relevé à la fin de chaque session.

G. Analyse statistique

Dans les expériences utilisant des lots non appariés, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour l'ensemble des lots

puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Mann-Whitney pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%. Dans le cas où l'expérience ne comprend que 2 lots, seul le test de Mann-Whitney est employé.

Cependant, dans la plupart des expériences, nous comparons des résultats obtenus avec le même lot d'animaux dans des conditions différentes. Dans ce cas, les lots sont appariés et les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Friedman pour l'ensemble des lots puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Wilcoxon pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%.

Nous utilisons des tests non paramétriques car le caractère gaussien des distributions n'est pas démontré.

III. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE

A. Présentation du test

La mise au point du labyrinthe en croix surélevé est basée sur les observations de Montgomery (1955) qui a montré que les rats avaient une préférence pour les bras fermés dans un labyrinthe en Y comprenant des bras ouverts et fermés en proportions variables. Pour expliquer cette préférence, il a proposé que la nouveauté évoquait à la fois la composante peur et la composante exploration du comportement de l'animal, générant ainsi un conflit approche-évitement. Il a considéré que les deux types de bras évoquaient la composante exploration mais que les bras ouverts évoquaient la composante peur à un degré plus élevé que les bras fermés, résultant ainsi en une exploration relative plus grande des bras fermés. Dans le cas où cette explication serait exacte, les substances anxiolytiques devraient augmenter l'exploration relative des bras ouverts, alors que les substances anxiogènes devraient la diminuer.

C'est pourquoi, Handley & Mithani (1984) ont conçu un modèle basé sur ce principe, dans lequel les rats exploraient un labyrinthe en croix surélevé comportant deux bras ouverts et deux bras fermés. Les résultats obtenus avec les animaux des lots contrôles ont montré que ce labyrinthe en croix surélevé fonctionnait comme le labyrinthe en Y utilisé par Montgomery (1955), c'est-à-dire que les rats montraient une préférence claire et significative pour les bras fermés (seulement 28% des entrées effectuées, concernaient les bras ouverts) et que le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts par rapport au nombre total d'entrées ne dépendait pas du nombre total d'entrées (Handley & Mithani, 1984). L'expression des résultats en proportion du nombre total d'entrées devrait permettre une certaine compensation des effets autres que ceux de la peur sur l'activité exploratrice et par

COMPOSE	CATEGORIE	REPONSE	REFERENCES
Carbamazépine	antiépileptique	+	Zangrossi *et al.*, 1989
Ethanol	alcool	+	Lister, 1987(souris)
LIGANDS RECEPTEURS BZD			
Chlordiazépoxide	1,4-BZD	+	Pellow *et al.*, 1985; Chopin & Briley, 1987; File, 1990; Lister, 1987 (souris)
Diazépam	1,4-BZD	+	Handley & Mithani, 1984; Pellow *et al.*, 1985 (chronique et aigu); Critchley & Handley, 1987; Moser *et al.*, 1988; Moser, 1989; Assié *et al.*, 1991; Wright *et al.*, 1991 (chronique et aigu)
Lorazépam	1,4-BZD	+	File *et al.*, 1988
Tofisopam	3,4-BZD	0	Pellow & File, 1986b
Adinazolam	triazolo-BZD	+	File & Pellow, 1985b
Alprazolam	triazolo-BZD	+	File & Pellow, 1985b
U-43,465	triazolo-BZD	+	File & Pellow, 1985b
CL 218,872	triazolopyridine	+	Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986a
CGS 9896	pyrazoloquinoline	+	File & Pellow, 1985b
ZK 91296	β-carboline	0	Pellow & File, 1986a
CGS 8216	pyrazoloquinoline, ag. inverse	-	Pellow & File, 1986a
Flumazénil (= Ro 15-1788)	imidazodiazépine,antag.	0	Pellow & File, 1986a; Chopin & Briley, 1987; Fernández-Teruel *et al.*, 1990 (administration périnatale)
		+	Fernández-Teruel *et al.*, 1990 (administration périnatale + handling postnatal)
ZK 93426	dérivé de β-carboline, antag.	0	Pellow & File, 1986a
Ro 5-4864	1,4-BZD, ligand réc. périph.	-	Pellow & File, 1986a
FG 7142	ag. inverse	-	Pellow & File, 1986a; File & Johnston, 1987; Lister, 1987 (souris)
LIGANDS RECEPTEURS GABA			
Progabide	ag. $GABA_A$ et $_B$	0	Chopin & Briley, 1987
LIGANDS SITE BARBITURIQUE			
Phénobarbitone	barbiturique	0	Pellow *et al.*, 1985
		+	Pellow *et al.*, 1985 (chronique)
Pentobarbital	?	+	Lister, 1987 (souris)
LIGANDS SITE PICROTOXINE			
Pentylènetétrazole	convulsivant	0	Pellow *et al.*, 1985
		-	File & Johnston, 1987
Picrotoxine	convulsivant	-	Handley & Mithani, 1984; Lister, 1987 (souris)
Tracazolate	pyrazolopyridine	+	Handley & Mithani, 1984; Pellow & File, 1986a

Tableau 21: Effets des composés agissant sur les récepteurs BZD ou le système GABAergique, dans le labyrinthe en croix surélevé. +: effet anxiolytique; -: effet anxiogène; 0: sans effet sur le niveau d'anxiété; ag.: agoniste; antag.: antagoniste.

conséquent, donner une mesure plus pure des changements de comportements motivés par la peur.

Les résultats obtenus par Handley & Mithani (1984), avec des substances anxiolytiques et anxiogènes, vont dans ce sens : le DZP et l'amylobarbitone (anxiolytiques) augmentent significativement la proportion d'entrées dans les bras ouverts, même en présence d'une sédation sévère. Etant donné que l'activité exploratrice n'est augmentée par aucune des doses testées, il est très peu probable que l'augmentation de la proportion d'entrées dans les bras ouverts puisse être due à une augmentation de la composante exploration ou de l'activité locomotrice. Les agents anxiogènes (picrotoxine et ACTH) réduisent l'exploration totale (Handley & Mithani, 1984). L'absence de sédation observable et de faiblesse générale suggère que cette réduction pourrait être attribuée soit à une réduction de la composante exploration ou de l'activité locomotrice, soit à une augmentation de la composante peur. Toutefois, les entrées dans les bras ouverts diminuent de façon plus importante que dans les bras fermés, aboutissant ainsi à une chute significative du rapport ouvert/total, comme le prédisait l'hypothèse initiale. Par conséquent, le test du labyrinthe en croix surélevé a été proposé par Pellow *et al.* (1985) comme modèle animal de l'anxiété, permettant l'évaluation des potentialités anxiolytiques ou anxiogènes de divers composés.

Le labyrinthe en croix surélevé a été très largement validé du point de vue pharmacologique et employé pour étudier les effets anxiolytiques ou anxiogènes de substances diverses, agissant notamment sur les récepteurs BZD et les systèmes GABAergique (Tableau 21), noradrénergique, sérotonergique, dopaminergique ou glutamatergique, cholécystokinine ou opioïdes. Dans la littérature, on observe des résultats contradictoires, à l'exception du système GABAergique où les agonistes des récepteurs BZD montrent soit une activité anxiolytique soit aucun effet, mais jamais une activité anxiogène, alors que les agonistes inverses et les antagonistes de ces récepteurs sont soit inactifs soit anxiogènes dans le labyrinthe en croix surélevé. Le seul ligand des récepteurs GABA ayant été évalué, le progabide, ne montre aucune activité dans ce test (Chopin & Briley, 1987). En ce qui concerne le système noradrénergique, les agonistes des adrénorécepteurs-$\alpha 2$ ont le plus souvent une activité anxiolytique , alors que les antagonistes de ces récepteurs sont soit sans effet (Moser, 1989), soit anxiogènes (Handley & Mithani, 1984). Les substances sérotonergiques montrent des résultats variables : le 8-OH-DPAT, par exemple, est un agoniste du récepteur 5-HT_{1A}, qui a montré selon le cas une activité anxiogène (Treit *et al.*, 1993), anxiolytique (Söderpalm *et al.*, 1989) ou aucune activité (Moser *et al.*, 1988) dans ce test. Par ailleurs, les agonistes et antagonistes des récepteurs opioïdes sont sans effet sur le niveau d'anxiété des animaux dans cette procédure (Chopin & Briley, 1987). Les psychostimulants comme les amphétamines ou la caféine sont anxiogènes (Pellow *et al.*, 1985). Les antagonistes des récepteurs NMDA ont montré

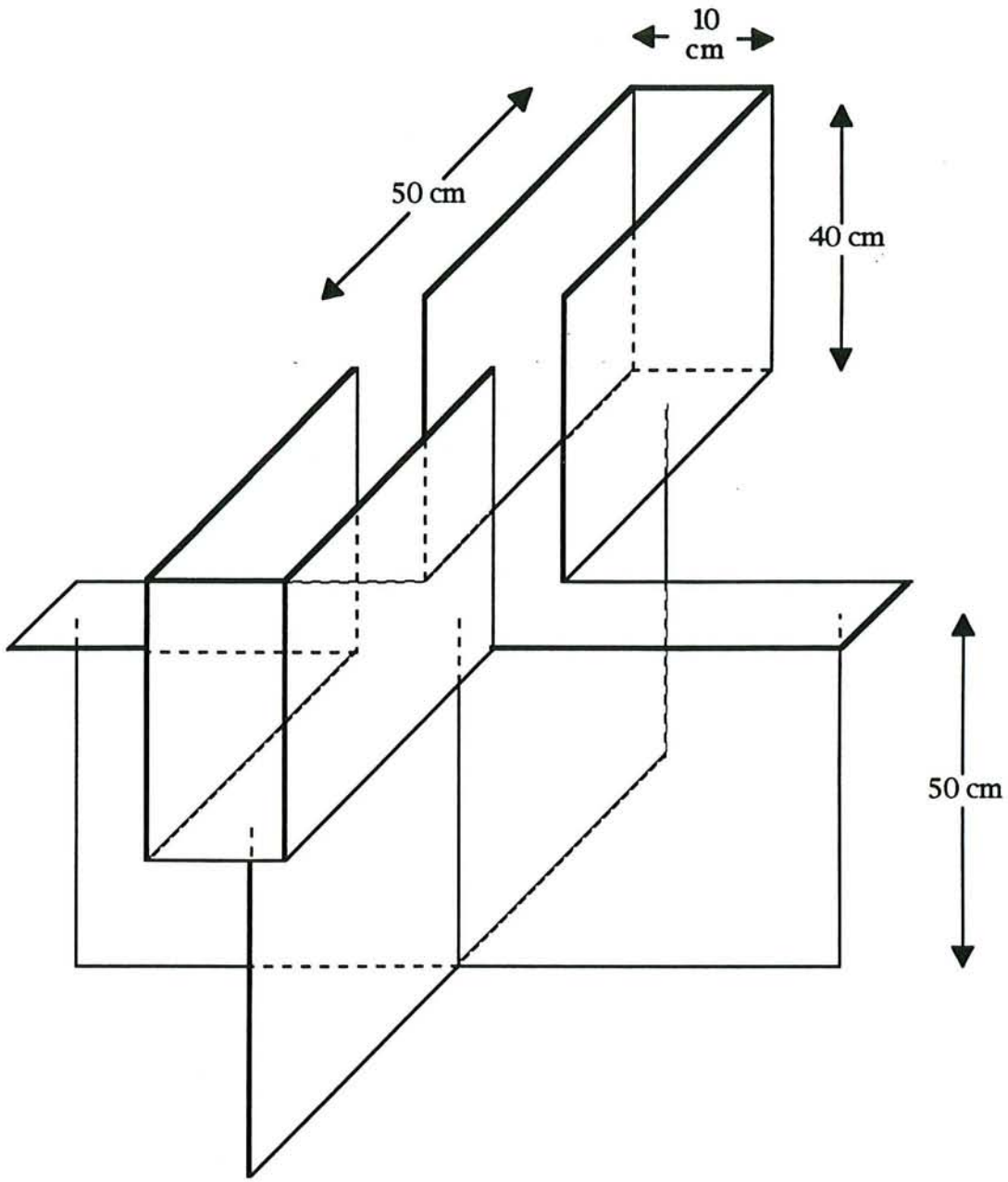


Figure 46: Schéma du labyrinthe en croix surélevé.

une activité anxiolytique dans ce test (Schmitt *et al.*, 1990). D'autre part, Lister (1987) a validé l'application de cette procédure pour la mesure de l'anxiété chez la souris.

Nous avons expérimenté le test du labyrinthe en croix surélevé avec le DZP, dans différentes conditions expérimentales. Les expériences présentées ici ont été réalisées en collaboration avec J.P. Schurra et J.F. Maître.

B. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar provenant, selon l'expérience, soit du centre d'élevage IFFA-CREDO, soit de l'élevage du laboratoire. A leur arrivée dans la salle d'expérimentation, les rats sont répartis au hasard dans des cages de 4 à 6 individus selon leur poids. Ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le cycle d'éclairement est de 12-12 h, la phase d'obscurité se situant entre 9 h et 21 h. Chaque animal est utilisé une seule fois dans cette procédure, sauf dans une expérience, où les rats effectuent 2 passages successifs dans le dispositif séparés de 100 mn mais ne reçoivent qu'un traitement.

C. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est un labyrinthe en forme de croix, surélevé de 50 cm au-dessus du sol et comportant deux bras ouverts et deux bras fermés (Figure 46). Une caméra est fixée au-dessus du dispositif et reliée à un écran TV ainsi qu'à un magnétoscope situés dans une pièce adjacente. Ce système permet d'observer l'animal sans le perturber et d'enregistrer la session sur cassette vidéo, afin d'effectuer un dépouillement précis des différents paramètres comportementaux grâce à un ordinateur.

D. Traitements

Le DZP est administré par voie i.p. sous forme de solution dans un mélange de deux solvants en proportions différentes (Transcutol et Tween80). Toutes les solutions sont préparées de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel. Les lots témoins sont traités avec du NaCl 9‰ et les lots contrôles avec les différents véhicules.

E. Procédure

30 mn après le traitement, le rat est placé dans une enceinte carrée en contre-plaqué peint pendant 5 mn. En effet, il a été montré que lorsque l'animal était

placé dans un environnement inconnu avant le test, l'activité locomotrice était accrue dans le labyrinthe, et plus précisément le nombre total d'entrées dans les bras était augmenté (Pellow & File, 1986a). Puis le rat est placé immédiatement dans le labyrinthe en croix surélevé pendant 5 mn. Selon l'expérience, le rat est placé soit au bout d'un bras fermé, soit au centre du dispositif, face à un bras ouvert. L'expérimentateur quitte la salle d'expérimentation immédiatement après avoir déposé l'animal dans le dispositif. Grâce au système d'enregistrement vidéo et à un ordinateur, le comportement du rat dans le labyrinthe est observé dans une pièce adjacente et peut être analysé soit simultanément, soit après l'expérience avec l'enregistrement vidéo. Le dispositif est nettoyé à l'aide d'un coton imbibé d'alcool entre les différents animaux.

F. Paramètres observés

- **TPS CENTRE :** Temps passé au centre en s. ;
- **TPS FER :** Temps passé dans les bras fermés en s. ;
- **TPS OUV :** Temps passé dans les bras ouverts en s. ;
- **% TPS CENTRE :** Pourcentage de temps passé au centre ;
- **% TPS FER :** Pourcentage de temps passé dans les bras fermés ;
- **% TPS OUV :** Pourcentage de temps passé dans les bras ouverts ;
- **NB ENT FER :** Nombre d'entrées effectuées dans les bras fermés ;
- **NB ENT OUV :** Nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts ;
- **NB TOT ENT :** Nombre total d'entrées effectuées dans les 4 bras ;
- **% NB ENT FER :** Nombre d'entrées effectuées dans les bras fermés en % par rapport au nombre total d'entrées effectuées ;
- **% NB ENT OUV :** Nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts en % par rapport au nombre total d'entrées effectuées ;
- **RED FER :** Nombre de redressements effectués dans les bras fermés ;
- **RED OUV :** Nombre de redressements effectués dans les bras ouverts ;
- **TOT RED :** Nombre total de redressements effectués ;
- **TOIL FER :** Nombre de toilettages effectués dans les bras fermés ;
- **TOIL OUV :** Nombre de toilettages effectués dans les bras ouverts ;
- **TOT TOIL :** Nombre total de toilettages effectués ;
- **DEF FER :** Nombre de défécations effectuées dans les bras fermés ;
- **DEF OUV :** Nombre de défécations effectuées dans les bras ouverts ;
- **TOT DEF :** Nombre total de défécations effectuées ;
- **MIC FER :** Nombre de mictions effectuées dans les bras fermés ;
- **MIC OUV :** Nombre de mictions effectuées dans les bras ouverts ;
- **TOT MIC :** Nombre total de mictions effectuées ;
- **LAT SORTIE :** Latence de sortie du premier bras en s. ;

COMPOSE	DOSE (mg/kg)	TEMPS (mn)	MARCHES MONTEES	REDRESSEMENTS	REFERENCES
BENZODIAZEPINES					
Chlordiazépoxide	8-16 p.o.	60	→	→	Simiand et al., 1984
	32-64 p.o.		→	↓	(souris)
	128 p.o.		↓	↓	
	8 p.o.	60	→	↑	Pollard & Howard, 1986
	16-64 p.o.		↓	→	(souris)
	16 i.p.	30	↑	↓	Quock et al., 1992 (souris)
	32-64 i.p.		↓	↓	
	1-4 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	8-32 i.p.		→	↓	
Diazépam	4 p.o.	60	→	→	Simiand et al., 1984
	8-32 p.o.		→	↓	(souris)
	64 p.o.		↓	↓	
	1-2 p.o.	60	→	→	Stéru et al., 1987 (souris)
	4-8 p.o.		↑	→	
	16-64 p.o.		→	↓	
	2-8 p.o.	30	→	↓	Keane et al., 1988 (souris)
	16-32 p.o.		↓	↓	
	0.5 i.p.	30	→	→	Quock et al., 1987 (souris)
	2-5 i.p.		→	↓	
	10 i.p.		↓	↓	
	2 i.p.	30	↑	→	Porsolt et al., 1988 (souris)
	2-5 i.p.	15	→	↓	Pruhs & Quock, 1989 (souris)
	0.5-1.5 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1973 (rat)
	2-4 i.p.		→	↓	
	6-8 i.p.		↓	↓	
ANTAGONISTE RECEPTEUR BZD					
Flumazénil	10 s.c.	30	→	→	Quock et al., 1992 (souris); Emmanouil & Quock, 1990 (souris)
AGONISTES INVERSES RECEPTEUR BZD					
Noreleagnine	0.3-3 i.p.	30	→	↓	Emmanouil & Quock, 1990
	10 i.p.		↓	→	(souris)
Ro 15-3505	1-12 i.p.	20	→	→	Emmanouil & Quock, 1990 (souris)
β-CCM	1 i.p.	30	↓	↓	Emmanouil & Quock, 1990 (souris)

Tableau 22: Effets de composés agissant sur le récepteur BZD dans le test de l'escalier. ↑: augmentation; ↓: diminution; →: aucun changement.

- **LAT ENT OUV1 :** Latence d'entrée dans le premier bras ouvert visité ;
- **TPS OUV1 :** Temps passé dans le premier bras ouvert visité ;
- **LAT EXTR OUV1 :** Latence d'arrivée à l'extrémité du premier bras ouvert visité ;

G. Analyse statistique

Etant donné qu'il s'agit de lots non appariés, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour l'ensemble des lots puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Mann-Whitney pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%. Dans le cas où l'expérience ne comprend que 2 lots, seul le test de Mann-Whitney est employé.

Nous utilisons des tests non paramétriques parce que le caractère gaussien des distributions n'est pas démontré.

IV. TEST DE L'ESCALIER

A. Présentation du test

Le test de l'escalier, ou "staircase test", est inspiré du test proposé par Thiébot *et al.* (1973). Il s'inscrit dans le cadre des tests de "situation libre" tout comme l'open-field, mais permet d'obtenir des résultats plus homogènes. Dans cette situation expérimentale, des réactions apparemment voisines peuvent subir, en fonction des doses, des modifications de sens opposé, après administration à l'animal de certaines substances (Thiébot *et al.*, 1973). Les auteurs ont obtenu, dans ce test, un profil identique (diminution du nombre de redressements effectués, avec des doses plus faibles que celles entraînant une diminution du nombre de marches montées et pentes des droites de régression pour les deux paramètres statistiquement différentes) pour différents médicaments comme le DZP (Tableau 22), l'oxazépam, le prazépam et le méprobamate. Par contre, les neuroleptiques testés modifiaient ces deux paramètres dans le même sens (diminution)(Tableau 23). De plus, ces auteurs ont reproduit ce test avec l'éthanol et l'amobarbital. A des doses faibles, ces substances augmentent le nombre de marches montées sans modifier significativement le nombre de redressements, alors qu'à des doses fortes, ils diminuent ces deux paramètres. C'est pourquoi, ce test a été proposé pour le classement des psychotropes.

Le rat, lorsqu'il n'est pas soumis à l'effet d'un anxiolytique, se trouve face à un conflit : son désir de fuite et d'exploration le pousse à monter les marches de l'escalier, mais le rat présente une aversion naturelle pour la nouveauté et pour la

COMPOSE	DOSE (mg/kg)	TEMPS (mn)	MARCHES MONTEES	REDRESSEMENTS	REFERENCES
HYPNOTIQUES					
Phénobarbital	32 p.o.	60	→	↓	Simiand et al., 1984
	64 p.o.		↑	↓	(souris)
	128 p.o.		→	↓	
	256 p.o.		↓	↓	
	8 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	16 i.p.		↑	→	
	32 i.p.		↑	↓	
	64 i.p.		→	↓	
	128 i.p.		↓	↓	
Mecloqualone	2-4 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	8 i.p.		↑	→	
	16 i.p.		↑	↓	
	32 i.p.		↓	↓	
TRANQUILLISANTS MINEURS NON BZD					
Méthaqualone	0.5-8 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	16 i.p.		→	↓	
NEUROLEPTIQUES					
Fluphénazine	0.062 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	0.125-0.25 i.p.		→	↓	
	0.5-2 i.p.		↓	↓	
Thioridazine	0.5-2 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1976 (rat)
	4-32 i.p.		↓	↓	
Chlorpromazine	1-2 p.o.	60	→	→	Simiand et al., 1984
	4-8 p.o.		↓	↓	(souris)
	1 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1973 (rat)
	2 i.p.		→	↓	
	4-16 i.p.		↓	↓	
Halopéridol	0.125 p.o.	60	→	→	Simiand et al., 1984
	0.25-2 p.o.		↓	↓	(souris)
	0.062-0.125 i.p.	30	→	→	Thiébot et al., 1973 (rat)
	0.5-1 i.p.		↓	↓	

Tableau 23: Effets de différents composés non benzodiazépiniques dans le test de l'escalier. ↑: augmentation; ↓: diminution; →: aucun changement.

montée des marches d'un escalier. La résultante de ce conflit est que le rat monte difficilement les marches. Par contre, les BZD ont pour effet de déplacer ce conflit dans le sens d'une augmentation de l'exploration et d'une diminution de la néophobie.

D'après Lat (1965), les redressements constitueraient un indice pertinent de l'état de vigilance de l'animal dans une situation donnée et ils seraient toujours liés à l'activité dominante, c'est-à-dire fuite ou exploration. Les redressements pourraient donc constituer un reflet de l'anxiété ou de l'émotivité des animaux lors des toutes premières mn d'un test, c'est-à-dire quand l'anxiété est dominante par rapport à l'activité exploratoire.

Par ailleurs, l'hypothèse du rôle inhibiteur de l'anxiété sur l'exploration a souvent été avancée. Or, dans le test de l'escalier, Thiébot *et al.* (1976) ont observé, au cours du temps, une liaison d'abord négative entre les redressements et le nombre de marches montées, puis une liaison progressivement positive et importante. Il semble donc envisageable de choisir les redressements comme reflet de l'émotivité ou de l'anxiété et les marches montées comme indice d'exploration. Il faut également préciser que la dissociation de ces deux comportements ne peut pas être due à des propriétés myorelaxantes de la substance. En effet, deux substances réputées myorelaxantes (chlormézanone et méphénézine) ont été appliquées à ce test et une telle dissociation n'a pas été mise en évidence (Thiébot *et al.*, 1973).

Ainsi, nous avons utilisé ce test chez le rat mâle Wistar, afin d'évaluer l'effet anxiolytique du DZP et du SK&F-89976-A, en dissolvant ces deux produits dans une solution de DMI à 25% (DZP et SK&F-89976-A) ou dans une solution d'éthanol à 10% (DZP). L'effet du DZP dans le test de l'escalier a également été étudié avec une autre souche de rat, la souche Long-Evans. Ce test a ensuite été appliqué, chez le rat Wistar, à la validation fonctionnelle de différents GABA- ou nipécotate-SLC, en solution dans un mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

B. Animaux

Les animaux utilisés sont des rats Wistar ou Long-Evans provenant, selon l'expérience, soit de centres d'élevage (IFFA-CREDO ou Janvier respectivement), soit de l'élevage du laboratoire. A leur arrivée dans la salle d'expérimentation, les rats sont répartis au hasard dans des cages de 4 à 6 individus selon leur poids. Ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le cycle d'éclairement est de 12-12 h, la phase d'obscurité se situant entre 9 h et 21 h. La naïveté vis-à-vis du dispositif étant requise, chaque animal n'est utilisé qu'une seule fois dans cette procédure.

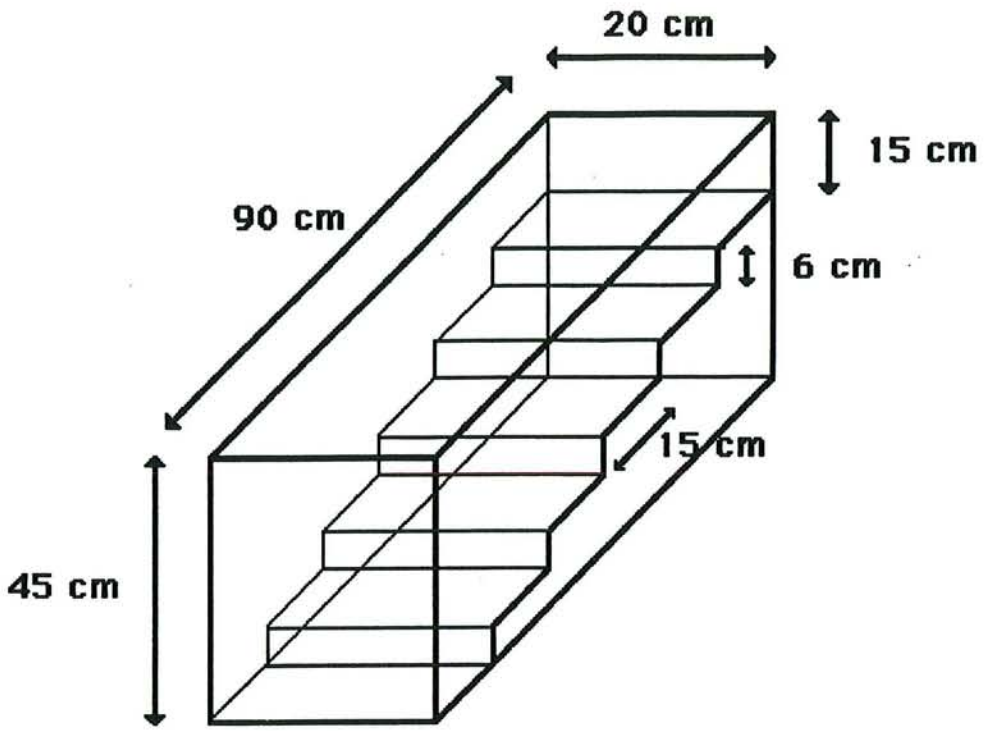


Figure 47: Schéma de l'escalier.

C. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est inspiré du test proposé par Molinengo & Ricci Gamalero (1970). Il est constitué d'une enceinte de contre-plaqué de 90 cm de long, 20 cm de large et 45 cm de hauteur (Figure 47). L'escalier construit à l'intérieur est composé de 5 marches de 6 cm de hauteur, 15 cm de profondeur et 20 cm de largeur. La face avant et le plafond de l'enceinte sont transparents afin de permettre une observation aisée de l'animal.

D. Traitements

Le DZP (par voie i.p. ou i.v.), le SK&F-89976-A (par voie i.p.) et les GABA- ou nipécotate-SLC (par voie i.v.) sont administrés en solution dans différents véhicules (éthanol, DMI ou mélange Transcutol/Tween80). Toutes les solutions sont préparées de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel en i.p. ou 0.5 ml en i.v.. Les lots témoins sont traités avec du NaCl 9‰ et les lots contrôles avec les différents véhicules.

E. Procédure

Les expérimentations sont effectuées dans la salle d'élevage des animaux pendant la période d'obscurité. L'injection, effectuée par voie i.p. ou i.v., est réalisée 30, 60 ou 120 mn avant le début du test. Après l'injection, le rat est maintenu isolé dans une cage jusqu'au test qui dure 3 mn. Le rat est alors déposé au bas de l'escalier, dos tourné aux marches et observé pendant les 3 mn.

F. Paramètres observés

ASC1 : nombre de marches montées pendant la première mn du test ;
ASC2 : nombre de marches montées pendant la deuxième mn du test ;
ASC3 : nombre de marches montées pendant la troisième mn du test ;
TOTASC : nombre total de marches montées pendant le test ;
DESC1 : nombre de marches descendues pendant la première mn du test ;
DESC2 : nombre de marches descendues pendant la deuxième mn du test ;
DESC3 : nombre de marches descendues pendant la troisième mn du test ;
TOTDESC : nombre total de marches descendues pendant le test ;
MARTOT : nombre total de marches montées ou descendues pendant le test ;
RED1 : nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, effectués pendant la première mn du test ;

RED2 : nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, effectués pendant la deuxième mn du test ;

RED3 : nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, effectués pendant la troisième mn du test ;

TOTRED : nombre total de redressements avec les pattes antérieures en l'air, effectués pendant le test ;

Rp1 : nombre de redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, effectués pendant la première mn du test ;

Rp2 : nombre de redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, effectués pendant la deuxième mn du test ;

Rp3 : nombre de redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, effectués pendant la troisième mn du test ;

TOTRp : nombre total de redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, effectués pendant le test ;

R+Rp1 : nombre de redressements des 2 types (RED et Rp), effectués pendant la première mn du test ;

R+Rp2 : nombre de redressements des 2 types (RED et Rp), effectués pendant la deuxième mn du test ;

R+Rp3 : nombre de redressements des 2 types (RED et Rp), effectués pendant la troisième mn du test ;

TOTRR : nombre total de redressements des 2 types (RED et Rp), effectués pendant le test ;

DEF1 : nombre de défécations pendant la première mn du test ;

DEF2 : nombre de défécations pendant la deuxième mn du test ;

DEF3 : nombre de défécations pendant la troisième mn du test ;

TOTDEF : nombre total de défécations pendant le test ;

TOIL1 : nombre de toilettages pendant la première mn du test ;

TOIL2 : nombre de toilettages pendant la deuxième mn du test ;

TOIL3 : nombre de toilettages pendant la troisième mn du test ;

TOTTOIL : nombre total de toilettages pendant le test ;

LATM1 : latence de montée de la première marche, en s. ;

LATM5 : latence de montée de la cinquième marche, en s..

G. Analyse statistique

Etant donné qu'il s'agit de lots non appariés, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour l'ensemble des lots puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Mann-Whitney pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%. Dans le cas où l'expérience ne comprend que 2 lots, seul le test de Mann-Whitney est

COMPOSE	DOSE i.p. (mg/kg)	TEMPS	ENFOUISSEMENT	ACTIVITE GENERALE	REFERENCES
CDP	1-3	30'	→	→	Treit *et al.*, 1981; Treit & Fundytus, 1988
	5-10	30'	↓	→	Treit *et al.*, 1981; Treit, 1987; Treit & Fundytus, 1988
DZP	0.5-2	15'	↓	non reporté	Tsuda *et al.*, 1988
	0.5-1	20'	↓	→	Blampied & Kirk, 1983
	0.1	30'	→	→	Treit *et al.*, 1981
	0.5-2		↓	→	
	0.5	30'	→		Fernández-Guasti &
	1		↓		Hong, 1989
	0.25-1	30'	↓	non reporté	Fernández-Guasti *et al.*, 1992
Ro 15-1788	5-10	10'	→	→	Treit, 1987
CDP	5	30']	→	→	Treit, 1987
+ Ro 15-1788	5 ou 10	10']			
CGS 8216	5-10	10'	→	→	Treit, 1987
CDP	5	30']	↓	→	Treit, 1987
+ CGS 8216	5	10']			
CDP	5	30']	→	→	Treit, 1987
+ CGS 8216	10	10']			
PTZ	20	30'	→	non reporté	Treit *et al.*, 1981
	5	10'	→	→	Treit, 1987
	20	10'	↓	→	
CDP	5	30']	→	→	Treit, 1987
+ PTZ	5	10']			
CDP	5	30']	↓	→	Treit, 1987
+ PTZ	20	10']			
Picrotoxine	0.5	30'	→	non reporté	Treit *et al.*, 1981
	1	10'	→	→	Treit, 1987
	2	10'	↓	→	Treit, 1987
CDP	5	30']	→	→	Treit, 1987
+ Picrotoxine	1	10']			
CDP	5	30']	↓	→	Treit, 1987
+ Picrotoxine	2	10']			
DZP	1	30']	→	non reporté	Treit *et al.*, 1982
+ Picrotoxine	1	15']			
β-CCE	0.1	0'	→	non reporté	Tsuda *et al.*, 1989
	0.5-5	0'	↑	non reporté	
Naloxone	3	10'	→	non reporté	Craft *et al.*, 1988
	10	10'	→	non reporté	Treit, 1985b
DZP	1	30']	↓	non reporté	Treit, 1985b
+ Naloxone	10	10']			
Pentobarbital	1	30'	→	→	Treit *et al.*, 1981
	3-6		↓	→	

Tableau 24: Effets de composés agissant sur le récepteur GABA/BZD, dans le test d'enfouissement défensif conditionné. ↑: augmentation; ↓: diminution; →: aucun changement.

employé. Nous utilisons des tests non paramétriques parce que le caractère gaussien des distributions n'est pas démontré.

V. TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE

A. Présentation du test

Il s'agit d'une procédure de conditionnement aversif. A l'origine, Pinel & Treit (1978) ont observé que les rats ayant reçu un choc électrique unique à travers une électrode fixée sur une paroi de l'enceinte d'expérimentation, retournaient vers l'électrode et l'enfouissaient avec la sciure disposée dans le fond de l'enceinte. Ils ont observé des taux significatifs d'enfouissement même lorsque le choc et le test étaient espacés de 20 jours. Les rats ayant reçu un choc par une électrode dans leur cage d'habitation enfouissent l'électrode lorsqu'elle est introduite par la suite dans l'enceinte d'expérimentation, alors que des rats ayant reçu un choc électrique à travers un plancher grillagé standard n'enfouissent pas une électrode placée dans l'enceinte. Le comportement d'enfouissement est réduit lorsqu'on modifie soit l'éclairage, soit la position de l'électrode, pendant l'intervalle entre le choc et le test (Pinel *et al.*, 1980). Si on administre un choc à un rat par une électrode parmi deux, on observe un enfouissement sélectif de cette électrode (Pinel & Treit, 1978). Le comportement d'enfouissement chez le rat serait donc dirigé par une association apprise entre un stimulus aversif (exemple : choc électrique) et un signal lié à ce stimulus (exemple : une électrode).

Un certain nombre d'agents anxiolytiques, y compris le CDP, le DZP et le pentobarbital (Tableau 24), produisent une suppression reproductible et dose-dépendante du comportement d'enfouissement défensif du rat (Treit *et al.*, 1981). De plus, l'efficacité relative de ces agents dans la suppression de l'enfouissement défensif chez le rat est comparable à leur efficacité relative dans les tests cliniques. Par contre, un certain nombre de substances non anxiolytiques, comme la d-amphétamine et la morphine, ne montrent pas d'effet significatif sur le comportement d'enfouissement défensif. Les effets varient cependant en fonction de l'intensité du choc électrique pour certaines substances. La chlorpromazine, un neuroleptique, supprime comme le DZP l'enfouissement défensif à des intensités faibles (1 mA), mais ses effets peuvent être dissociés de ceux du DZP en augmentant l'intensité du stimulus aversif : à 10 mA, les effets suppresseurs du DZP sont complètement éliminés, alors que ceux de la chlorpromazine ne sont quasiment pas affectés (Treit *et al.*, 1981). L'ensemble de ces résultats suggère que l'enfouissement défensif présente les critères pharmacologiques de sensibilité dose-dépendante, d'efficacité relative et de sélectivité. La validation pharmacologique de cette

procédure a été élargie à des composés variés et ce test a été proposé comme modèle animal de l'anxiété (Treit *et al.*, 1981).

Nous avons envisagé cette procédure pour vérifier les effets de type BZD observés avec les GABA- et nipécotate-SLC dans le test de l'escalier. Nous avons également traité un lot d'animaux avec du DZP afin de comparer les effets des SLC à ceux des BZD.

B. Animaux

60 rats mâles Wistar de 150-200g, provenant du centre d'élevage IFFA-CREDO, ont été utilisés. A leur arrivée au laboratoire, les rats sont répartis au hasard dans des cages de 6 individus dans la salle d'élevage et sont maintenus ainsi pendant 2 semaines. Ils disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le cycle d'éclairement est de 12-12 h. La phase d'obscurité se situe entre 8 h et 20 h.

C. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental est constitué d'une cage transparente de dimensions 44 x 28 x 18 cm, dont le fond est tapissé d'une couche de sciure d'une épaisseur de 4 cm environ. La cage est disposée dans une pièce insonorisée. Sur une face latérale, un orifice permet la fixation d'une électrode.

L'électrode est une sonde en plexiglas, de dimensions 7 x 2 x 0.5 cm, recouverte d'un circuit imprimé en cuivre dont l'écartement des fils est de 1 mm, afin qu'une patte de rat se posant sur l'électrode fasse aisément contact entre 2 fils et permette le passage du courant. L'électrode est reliée à un générateur de chocs électriques à déclenchement manuel. Le déclencheur est placé dans une pièce adjacente.

Une caméra vidéo est disposée face à la cage, à une distance de 1 m, et reliée à un moniteur de contrôle ainsi qu'à un magnétoscope situés dans la pièce adjacente avec le déclencheur. Ce système permet d'observer l'animal sans le perturber et d'enregistrer la session sur cassette vidéo, afin d'effectuer un chronométrage et un comptage précis des différents paramètres comportementaux.

D. Traitements

Les GABA- et nipécotate-SLC sont administrés, par voie i.v., en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, une heure avant le test. Toutes les solutions sont préparées de manière à injecter 0.5 ml de solution par kg de poids corporel. Le lot contrôle est traité avec le véhicule seul.

E. Procédure

Pendant les 2 jours qui précèdent le test d'enfouissement, les rats sont transportés dans la salle d'expérimentation et tous les animaux d'une cage sont introduits en même temps dans la cage expérimentale pendant 30 mn. Ces 2 périodes de familiarisation sont destinées à habituer les animaux aux manipulations et au dispositif expérimental. Pendant ces 2 périodes, l'électrode n'est pas en place. La sciure est renouvelée à chaque changement de cage.

Le jour de l'expérience, les rats sont traités avec les différentes substances à tester, les différents traitements étant attribués au hasard. Les expériences sont réalisées pendant les 5 premières h de la phase d'obscurité, période de la journée où les animaux sont le plus actifs. 1 h après l'administration i.v. du traitement, chaque rat est testé individuellement dans le dispositif, l'électrode étant en place. Dès que le rat a été placé dans le dispositif, l'expérimentateur se rend dans la pièce adjacente et, grâce au moniteur de contrôle et au déclencheur de choc, un choc électrique unique, de faible intensité (2 mA), est délivré à l'animal lorsqu'il pose, pour la première fois, au moins une patte sur l'électrode. Le comportement du rat est alors enregistré pendant les 8 mn suivant le choc. Le rat est éliminé de l'expérimentation s'il n'a pas touché l'électrode au bout de 5 mn. La sciure est renouvelée pour chaque animal.

F. Paramètres observés

Grâce aux enregistrements vidéos, le comportement des rats est ensuite dépouillé avec précision, en utilisant les paramètres suivants :

TPS A DROITE : Temps passé dans la moitié droite de la cage, dépourvue d'électrode, en s. ;

%TPS A DROITE : Pourcentage de temps passé dans la moitié droite de la cage, dépourvue d'électrode, par rapport à la durée totale du test ;

TPS CONTACT : Durée totale des contacts avec l'électrode, en s. ;

%TPS CONTACT : Pourcentage de temps passé en contact avec l'électrode, par rapport à la durée totale du test ;

TPS ENFOUISST : Durée totale d'enfouissement de l'électrode, en s. ;

%TPS ENFOUISST : Pourcentage de temps passé à enfouir l'électrode, par rapport à la durée totale du test ;

TPS TOILETTAGE : Durée totale des toilettages, en s. ;

NB APPROCHES : Nombre d'approches effectuées vers l'électrode ;

NB FUITES : Nombre de fuites effectuées vis-à-vis de l'électrode ;

FUITES/APPR% : Pourcentage de fuites effectuées par rapport au nombre total d'approches ;

REDRESSEMENTS : Nombre de redressements sur les pattes postérieures, les pattes postérieures étant ou non appuyées sur les parois de la cage ;

NB TRANSITIONS : Nombre de transitions effectuées de la moitié de la cage comportant l'électrode à l'autre moitié ;

L'enfouissement correspond à la projection de sciure dans la direction de l'électrode par des mouvements rapides des pattes antérieures, le rat faisant face à l'électrode. Une approche correspond à une avancée du rat vers l'électrode avec ou sans contact. Une fuite correspond à une vive réaction de retrait par rapport à l'électrode et une fuite à l'opposé de l'électrode, une fuite faisant généralement suite à une approche. La mesure du nombre de transitions que le rat effectue, d'une moitié de la cage à l'autre, permet d'évaluer l'activité locomotrice.

Les résultats concernant le temps passé dans la moitié droite de la cage (sans électrode), le durée totale des contacts avec l'électrode et la durée totale de l'enfouisssement seront exprimés en durées et en pourcentage de temps passé pendant la durée du test. Les toilettages seront exprimés en durée moyenne également car sur une période de 8 mn, la durée semble plus pertinente que la fréquence. Par contre, les redressements, transitions, fuites et approches seront exprimés en fréquence.

G. Analyse statistique

Etant donné qu'il s'agit de lots non appariés, les comparaisons statistiques sont effectuées à l'aide du test de Kruskal-Wallis pour l'ensemble des lots puis, lorsqu'une hétérogénéité significative au risque 5% apparaît, du test de Mann-Whitney pour les comparaisons 2 à 2, le seuil de significativité étant fixé à 5%.

Nous utilisons des tests non paramétriques parce que le caractère gaussien des distributions n'est pas démontré.

CHAPITRE 4

MISE AU POINT DES TESTS COMPORTEMENTAUX AVEC DIFFERENTS VEHICULES

L'un des inconvénients techniques majeurs dans l'évaluation des effets comportementaux des BZD et des SLC appliqués au GABA et au nipécotate dans différents modèles animaux est leur insolubilité dans l'eau. En effet, comme nous l'avons vu auparavant, pour pouvoir diffuser à travers la BHE, une substance neuroactive doit être liposoluble. Cette propriété constitue donc un avantage en ce qui concerne l'efficacité de la substance, mais en ce qui concerne la préparation d'une solution à injecter dans l'organisme, c'est un désavantage important. L'emploi de solvants liposolubles est donc obligatoire pour les administrations par voie i.p. et surtout i.v.. De tels solvants sont souvent des alcools pouvant avoir des effets non négligeables sur le comportement.

En effet, dans la première série d'expériences réalisées avec le DZP (chapitre suivant), nous avons remarqué que les solvants employés (éthanol à 10% et DMI) modifiaient, de façon plus ou moins marquée, les données obtenues dans différents modèles animaux, comme le test de suppression néophobique de la prise de boisson, le test de l'escalier ou le test des convulsions induites par le PTZ. Dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson par exemple, l'utilisation du DMI à 25% comme véhicule d'injection, n'altérait pas significativement la qualité des résultats. Par contre, dans le test de l'escalier, les effets du DMI étaient très importants. Dans ce test, qui fait beaucoup plus appel aux capacités motrices du rat, on observait une diminution de l'activité générale de l'animal et une perte de l'équilibre qui modifiaient très nettement les résultats. Ces expériences nous ont montré qu'il était toujours souhaitable de tester les effets du véhicule employé, et ceci dans chaque procédure expérimentale, afin de vérifier qu'il n'interférait pas avec les comportements pris en compte. C'est pourquoi, dans les expériences qui ont suivi, nous avons jugé préférable de constituer à chaque fois, un lot d'animaux témoins, traités avec du NaCl 9‰ en plus du lot contrôle, traité avec le véhicule utilisé.

Les SLC que nous avons à étudier, doivent être administrés par voie i.v.. Leurs caractéristiques chimiques nous obligent à utiliser un solvant liposoluble. L'éthanol et le DMI, premiers solvants proposés, ont provoqué des atteintes motrices non négligeables, comme nous le verrons dans le chapitre suivant, et ont été remplacés par un mélange de Transcutol et de Tween80. Le transcutol est un alcool qui permet de mettre la substance à injecter en solution et le Tween80 est un co-solvant ionique émulsifiant permettant le maintien de la solution en suspension. Dans ce chapitre, nous décrirons les effets de ce mélange dans différents modèles animaux destinés à tester les SLC.

TRAITEMENT	N	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
NaCl	18	MOYENNE	2,3	9,7	6,2
		ES	0,4	3,1	1,6
Tr30+Tw10	12	MOYENNE	1,8	11,2	5,8
		ES	0,5	4,0	1,6

Tableau 25: Expérience n°1A: Effet du mélange Transcutol 30%, Tween 80 10% (i.v. 60 mn avant le PTZ) sur la latence d'apparition, l'intensité et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ chez le rat Wistar.

TRAITEMENT	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
NaCl 1	MOYENNE	4,7	1,1	11,1
	ES	0,2	0,1	2,5
NaCl 2	MOYENNE	5,0	1,1	9,2
	ES	0,0	0,1	2,4
Tr20+Tw20	MOYENNE	3,7	4,7	75,6 a
	ES	0,5	2,3	13,3
NaCl 3	MOYENNE	4,4	1,9	45,5 a
	ES	0,2	0,5	13,9
Tr30+Tw10	MOYENNE	4,7	1,4	59,2 a
	ES	0,2	0,2	16,7

Tableau 26: Expérience n°2A: Effet de différents véhicules (i.v. 60 mn avant le PTZ) sur l'intensité ,la latence d'apparition et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ chez le rat Wistar. NaCl1: premier test avec NaCl 9‰; NaCl2: second test avec NaCl 9‰; NaCl3: troisième test avec NaCl 9‰; Tr20+Tw20: Mélange Transcutol 20%, Tween80 20%; Tr30+Tw10: Mélange Transcutol 30%, Tween80 10%; a: $p < .01$ par rapport aux lots NaCl1 et NaCl2 (test de Wilcoxon).

I. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ

A. Expérience n°1A : Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v. 60 mn avant le PTZ) sur les crises comportementales induites par le PTZ (lots non appariés)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 30 rats mâles Wistar de 180-230 g (IFFA-CREDO).

Dans cette expérience, les animaux traités avec le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% sont des individus différents de ceux qui reçoivent une injection de NaCl 9‰.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant l'administration i.p. de PTZ à la dose de 40 mg/kg, en solution dans du NaCl 9‰ :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 18) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12).

2. Résultats

Le tableau 25 présente les résultats obtenus pour les lots témoin et contrôle. L'analyse de ces résultats par le test de Mann-Whitney n'a montré aucune différence significative entre les deux lots :

- Intensité de la crise : $z = -0.07$; N.S.
- Latence d'apparition de la crise : $z = -0.04$; N.S.
- Durée de la crise : $z = -0.09$; N.S.

Le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% semble donc sans effet sur le déroulement de la crise comportementale induite par le PTZ, lorsqu'il est administré 60 mn avant le PTZ. L'intensité des crises, dont le maximum est le stade 5, est cependant assez faible pour les deux lots (NaCl 9‰ : 2.3 ± 0.4 ; Transcutol 30%, Tween 80 10% : 1.8 ± 0.5). Etant donné qu'on souhaite mettre en évidence les effets anticonvulsivants du GABA et des BZD, il est préférable d'induire des crises maximales dans les lots témoins et contrôles. La dose de PTZ employée dans cette expérience (40 mg/kg) apparaît donc comme trop faible et a été amenée à 45 mg/kg dans l'expérience suivante.

B. Expérience n°2A : Effet du mélange Transcutol/Tween80 en proportions variables (i.v. 60 mn avant le PTZ) sur les crises comportementales induites par le PTZ (lots appariés)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 7 rats sélectionnés parmi 23 rats mâles Wistar de 200-250 g (IFFA-CREDO).

On observe généralement une grande variabilité interindividuelle en ce qui concerne la sensibilité au PTZ. Pour éliminer cette variabilité, il est préférable d'employer les mêmes individus pour comparer les effets de différents traitements sur les convulsions. A condition d'être suffisamment espacées dans le temps (48 h), les crises peuvent être provoquées plusieurs fois chez le même animal sans interférence entre les effets des différentes injections. Par conséquent dans cette expérience, contrairement à l'expérience précédente, les mêmes individus ont été utilisés pour mesurer les effets des différents véhicules sur les crises comportementales. Dans un premier temps, 23 animaux ont été testés pour leur sensibilité au PTZ. Au cours des deux premiers tests, les rats recevaient une injection de NaCl 9‰ suivie 1 h plus tard d'une injection de PTZ à 45 mg/kg. Les animaux réalisant une crise comportementale atteignant le stade 4 ou 5 lors de ces deux tests étaient conservés pour l'expérience. Parmi les 23 animaux de départ, 7 rats ont ainsi été sélectionnés.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant l'administration i.p. de PTZ à la dose de 45 mg/kg, en solution dans du NaCl 9‰ :
  * 3 tests témoins : NaCl 9‰ (N = 7) ;
  * Tests avec solvants : Mélange Transcutol 20%, Tween80 20% (N = 7) ;
    Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 7).

2. Résultats

L'augmentation de la dose de PTZ administrée aboutit, comme nous le souhaitions, à une augmentation de l'intensité moyenne des crises par rapport à l'expérience n°1A (Tableaux 25-26). Les moyennes sont à présent très proches du stade maximum, condition favorable pour la mise en évidence d'effets anticonvulsivants.

Nous avons testé deux concentrations différentes de solvants en i.v., 1 h avant l'injection de PTZ : le mélange Transcutol 20%, Tween80 10% et le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (Tableau 26).

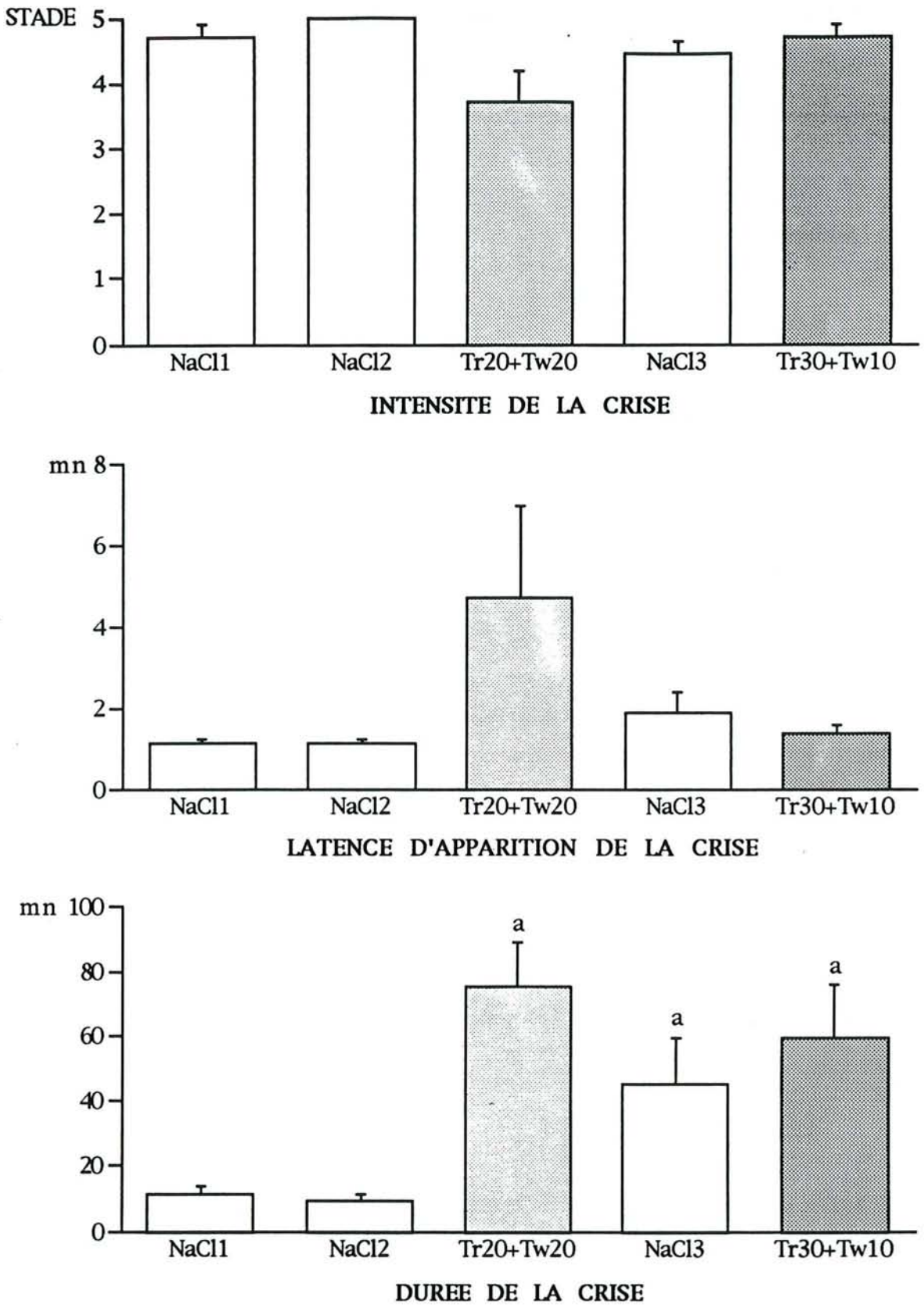


Figure 48: Expérience n°2A: Effet de différents véhicules (i.v. 60 mn avant le PTZ) sur l'intensité (haut), la latence d'apparition (milieu) et la durée (bas) de la crise comportementale induite par le PTZ chez le rat Wistar. NaCl1: premier test avec NaCl 9‰; NaCl2: second test avec NaCl 9‰; NaCl3: troisième test avec NaCl 9‰; Tr20+Tw20: Mélange Transcutol 20%, Tween80 20%; Tr30+Tw10: Mélange Transcutol 30%, Tween80 10%; a: $p < .01$ par rapport aux lots NaCl1 et NaCl2 (test de Wilcoxon).

Le test de Friedman montre les résultats suivants (DDL = 4, N = 7) :

- Intensité de la crise : $Chi^2 = 9.47$; NS
- Latence d'apparition de la crise : $Chi^2 = 4.98$; NS
- Durée de la crise : $Chi^2 = 21.37$; $p = .0003$

Nous n'avons obtenu aucune différence statistiquement significative entre les différents lots en ce qui concerne la latence d'apparition et l'intensité de la crise comportementale (Figure 48). Par contre, en ce qui concerne la durée des crises, on observe une hétérogénéité entre les différents tests. Toutefois, ce paramètre n'est pas stable au cours des différentes expériences avec le NaCl 9‰, on ne peut donc pas en tenir compte pour analyser les effets du mélange Transcutol, Tween80 (Figure 48). Le mélange Transcutol 20%, Tween80 20% tend cependant à augmenter la latence d'apparition des crises et à réduire leur sévérité, mais ces modifications ne sont pas significatives du point de vue statistique.

C. Discussion

Les résultats de l'expérience n°2A confirment les conclusions de l'expérience n°1A, c'est-à-dire que le mélange Transcutol/Tween 80 n'interfère pas d'une manière significative avec le déroulement des convulsions provoquées par le PTZ. L'ensemble de ces résultats nous a conduit à accorder une préférence au mélange Transcutol 30%, Tween80 10% qui permet d'obtenir des valeurs d'intensité, de latence d'apparition et de durée des crises comportementales, plus proches de celles obtenues avec le NaCl9‰ que le mélange Transcutol 20%, Tween80 20%. C'est pourquoi, ce mélange sera employé dans les expériences concernant les SLC. Par ailleurs, la dose de 45 mg/kg est préférable à la dose de 40 mg/kg, puisqu'elle conduit à des convulsions submaximales, idéales pour l'évaluation des effets anticonvulsivants du GABA, du SK&F-89976-A et des BZD.

II. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE

A. Expérience n°3A : Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.p. 35 mn avant le test)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 24 rats mâles Wistar de 300-350 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le passage dans l'enceinte inconnue et 35 mn avant le passage dans le labyrinthe :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot solvants : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12).

PARAMETRE	TRAITEMENT	
	NaCl 9‰ (moyenne ± E.S.)	Transcutol 30%, Tween80 10% (moyenne ± E.S.)
TPS CENTRE	44.1 ± 7.5	21.9 ± 8.2 *
TPS FER	242.4 ± 9.3	271.4 ± 11.3 *
TPS OUV	13.5 ± 4.4	6.7 ± 4.8
% TPS CENTRE	14.7 ± 2.5	7.3 ± 2.7 *
% TPS FER	80.8 ± 3.1	90.5 ± 3.8 *
% TPS OUV	4.5 ± 1.5	2.2 ± 1.6
NB ENT FER	7.5 ± 0.4	4.7 ± 1.2 *
NB ENT OUV	1.1 ± 0.4	0.6 ± 0.4
NB TOT ENT	8.6 ± 0.5	5.3 ± 1.4 *
% NB ENT FER	88.2 ± 3.5	94.8 ± 3.0
% NB ENT OUV	11.8 ± 3.5	5.2 ± 3.0
RED FER	18.5 ± 1.4	11.7 ± 2.0 *
RED OUV	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1
TOT RED	18.7 ± 1.4	11.8 ± 2.1 *
TOT TOIL	1.3 ± 0.3	1.6 ± 0.6
TOT DEF	0.9 ± 0.4	1.3 ± 0.5
LAT SORTIE	28.3 ± 7.9	160.7 ± 36.9 *
LAT ENT OUV1	225.3 ± 31.8	250.3 ± 33.1
TPS OUV1	7.1 ± 2.1	1.5 ± 1.0 *
LAT EXTR OUV1	79.2 ± 12.8	276.1 ± 23.9

Tableau 27: Expérience n°3A: Effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.p. 35 mn avant le test) dans le labyrinthe en croix surélevé chez le rat Wistar. Test de Mann-Whitney: *: $p < .05$ par rapport au NaCl 9‰. N = 12 par lot.

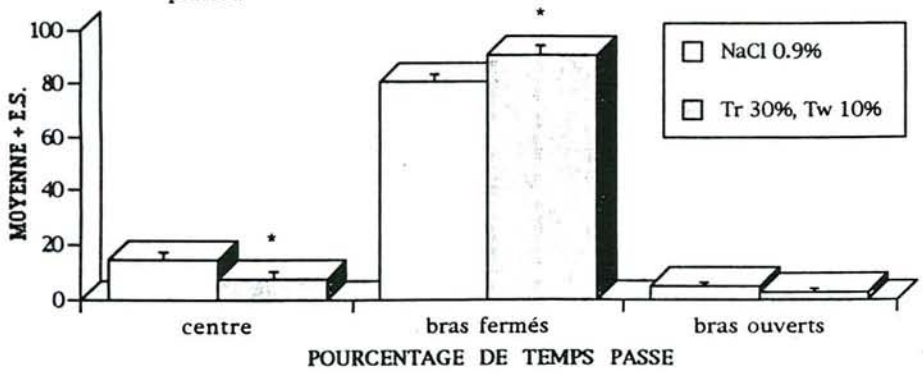


Figure 49: Expérience n°3A: Effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% sur le pourcentage de temps passé dans les différentes parties du labyrinthe en croix surélevé. *: $p < .05$ par rapport au NaCl 9‰.

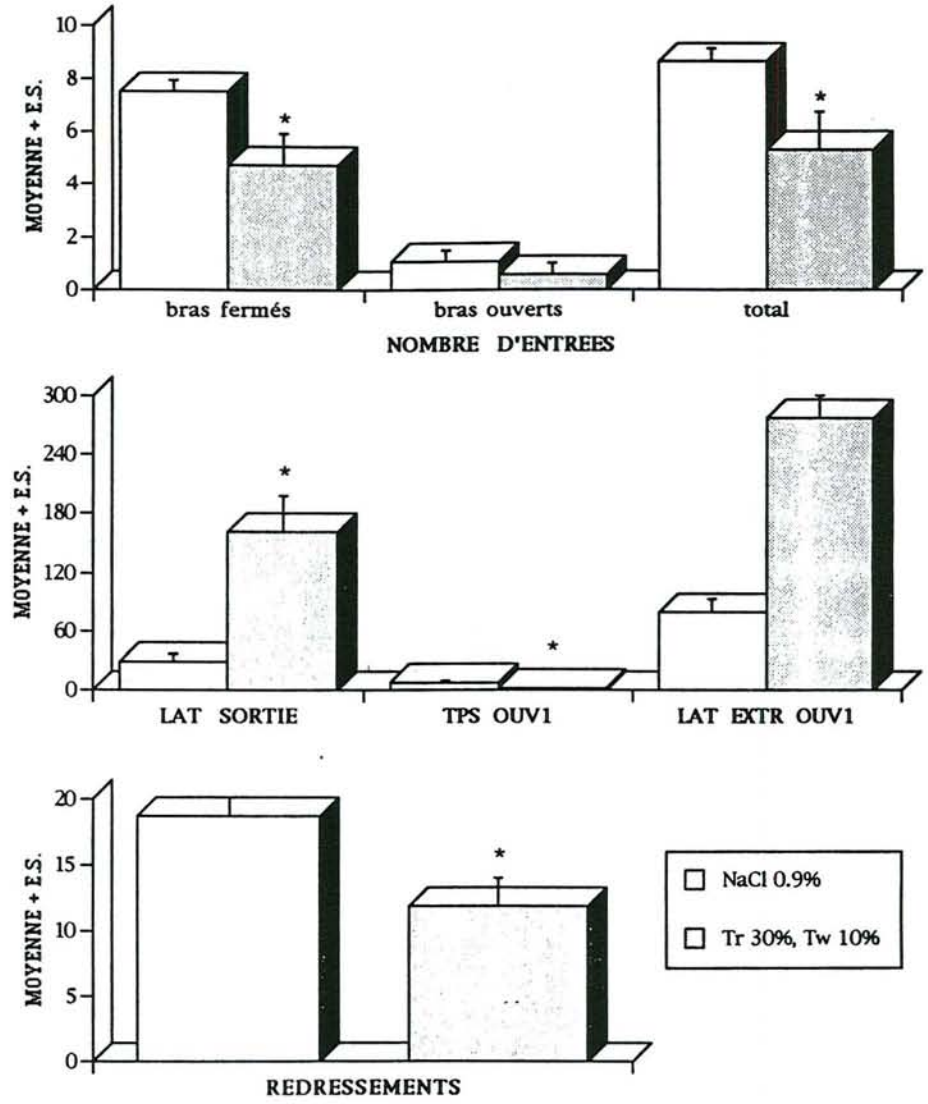


Figure 50: Expérience n°3A: Effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.p. 35 mn avant le test) sur le nombre d'entrées effectuées dans les bras (haut), sur la latence de sortie du premier bras visité (LAT SORTIE), le temps passé dans le premier bras ouvert visité (TPS OUV1) et la latence d'arrivée à l'extrémité du premier bras ouvert visité (LAT EXTR OUV1)(milieu) et sur le nombre de redressements effectués (bas) chez le rat Wistar. Test de Mann-Whitney: *: $p < .05$ par rapport au NaCl 9‰.

2. Résultats - Discussion

Une étude préliminaire (résultats non présentés) a montré que l'administration des mélanges Transcutol 10%, Tween80 10% ou Transcutol 20%, Tween80 20% ne modifiait pas le comportement des rats dans le labyrinthe en croix surélevé par rapport à un lot témoin ayant reçu une injection de NaCl 9‰. Nous avons ensuite évalué les effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% dans ce test (Expérience n°3A, Tableau 27).

D'après l'analyse par le test de Mann-Whitney, les rats traités avec le mélange de solvants montrent une préférence accrue pour les bras fermés par rapport au lot témoin. En effet, ils passent d'une part statistiquement plus de temps dans les bras fermés, et d'autre part moins de temps au centre du dispositif et dans le premier bras ouvert visité que les rats témoins (Figures 49-50). Cette modification de la répartition spatio-temporelle est significative à la fois en temps passé et en pourcentage de temps passé dans les bras fermés et le centre, mais ne peut toutefois pas être assimilée à une augmentation du niveau d'anxiété des animaux. En effet, le nombre total d'entrées dans les bras est également diminué par le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (Figure 50). Par conséquent, il s'agit d'une réduction globale de l'activité locomotrice. On observe également une diminution du nombre de redressements (Figure 50), cette diminution étant particulièrement significative dans les bras fermés où les animaux séjournent pendant la majeure partie du temps. On note également une très forte augmentation de la latence de sortie du bras dans lequel le rat est déposé au début du test (Figure 50). Le mélange de solvants provoque donc une diminution générale de l'activité locomotrice dans le labyrinthe en croix surélevé.

III. TEST DE L'ESCALIER

A. Expérience n°4A : Effet du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v., 30 mn avant le test)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 16 rats femelles Wistar de 200-250 g (élevage du laboratoire).

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v. (0.5 ml/kg), 30 mn avant le passage dans l'escalier :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 8) ;
  * Lots solvants : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 8).

TRAITEMENT	NaCl 0.9%		Transcutol 30%, Tween80 10%	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	5,5	0,3	6,0	0,8
ASC2	8,8	0,9	6,1	1,0
ASC3	7,1	0,9	6,9	1,3
TOTASC	21,4	1,3	19,0	2,6
DESC1	3,6	0,6	2,6	0,6
DESC2	7,5	0,7	6,4	1,4
DESC3	7,9	0,9	7,0	1,4
TOTDESC	19,0	1,3	16,0	2,9
MARCHES TOT	40,4	2,5	35,0	5,5
R+Rp1	7,1	0,7	8,4	0,6
R+Rp2	11,5	1,2	10,3	1,4
R+Rp3	14,8	0,8	12,0	0,9
TOTRR	33,4	2,0	30,6	1,8
DEF1	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF2	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF3	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTDEF	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL1	0,1	0,1	0,1	0,1
TOIL2	0,3	0,2	0,1	0,1
TOIL3	0,1	0,1	0,1	0,1
TOTTOIL	0,5	0,3	0,4	0,4
LAT M1	10,1	1,9	19,3 *	2,4
LAT M5	56,1	8,3	62,3	7,9

Tableau 28: Expérience n°4A: Effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v. 30 mn avant le test), dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au NaCl 9‰. N = 8 par lot.

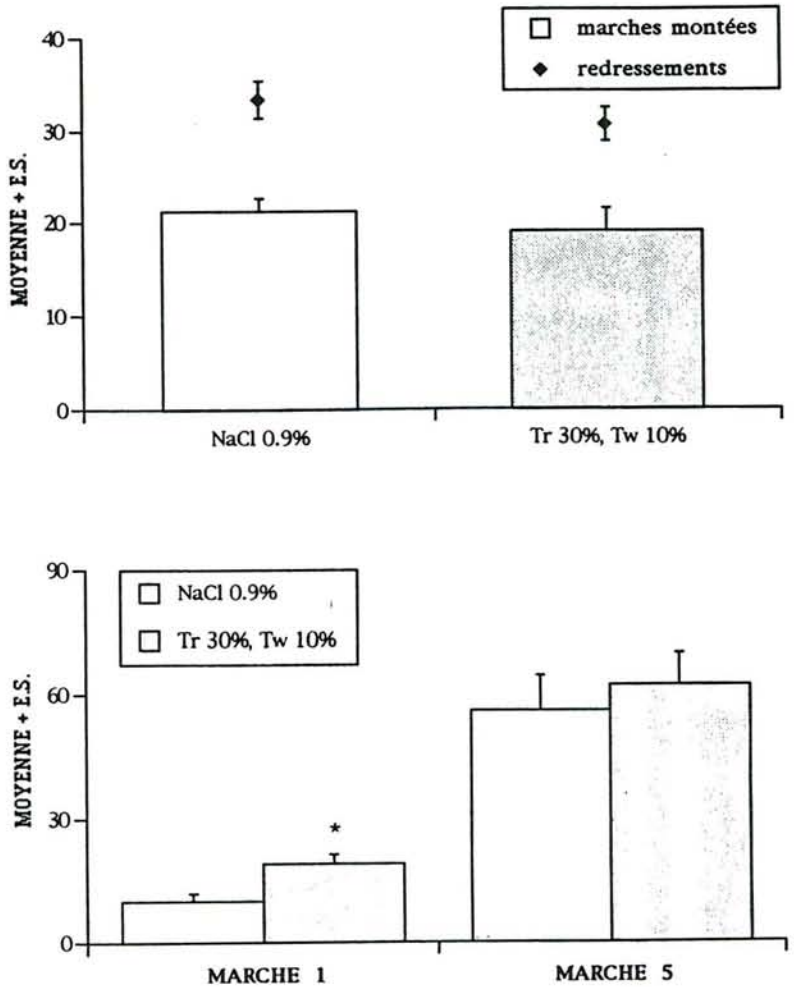


Figure 51: Expérience n°4A: Effets du mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (i.v. 30 mn avant le test), sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur la latence de montée de la première et de la dernière marche (bas), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au NaCl 9‰.

2. Résultats

Le tableau 28 présente les résultats de l'expérience n°4A. L'analyse par le test de Mann-Whitney montre une différence statistiquement significative entre le NaCl 9‰ et le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, uniquement pour la latence de montée de la première marche (Tableau 28). Le lot traité avec le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% met plus de temps à monter la première marche de l'escalier que le lot ayant reçu une injection de NaCl 9‰ (Figure 51). Aucune modification n'est observée en ce qui concerne les redressements et la montée des marches (Figure 51).

Par conséquent, l'emploi de ce mélange de solvants ne semble pas modifier significativement les paramètres comportementaux pris en compte dans le test de l'escalier. L'activité générale et en particulier l'activité locomotrice des rats traités avec le mélange de solvants semble toutefois légèrement plus faible que celle des rats du lot témoin.

B. Expérience n°5A : Effet du mélange Transcutol/Tween80 en différentes proportions (i.v. 60 mn avant le test)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 48 rats mâles Wistar de 150-180 g (IFFA-CREDO).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v. (0.5 ml/kg), 60 mn avant le passage dans l'escalier :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lots solvants : Mélange Transcutol 10%, Tween80 10% (N = 12) ;
    Mélange Transcutol 20%, Tween80 20% (N = 12).
    Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12).

2. Résultats

Le mélange de solvants a donc été évalué avec une durée plus longue entre l'injection et le test dans cette expérience, le test étant réalisé 60 mn après l'injection au lieu de 30 mn dans l'expérience n°4A. Dans ces conditions, nous avons comparé les effets du mélange Transcutol / Tween80 en proportions variables à un lot témoin ayant reçu du NaCl 9‰ (Tableau 29).

Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les quatre lots, avec le test de Kruskal-Wallis (DDL = 3, N = 48) :

TRAITEMENT	NaCl 0.9 %		Tr10%, Tw10%		Tr20%, Tw20%		Tr30%, Tw10%	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,8	0,6	2,6	0,6	4,4	0,7	3,1	0,6
ASC2	5,8	0,5	4,3	0,5	4,9	0,8	4,3	0,9
ASC3	4,9	0,8	4,8	0,6	5,4	0,8	4,3	0,6
TOTASC	14,5	1,2	11,6	0,9	14,8	1,7	11,8	1,3
DESC1	2,1	0,6	0,8	0,2	2,3	0,7	1,3	0,4
DESC2	5,4	0,8	2,9	0,7	4,7	0,9	4,3	1,1
DESC3	5,3	0,4	5,7	0,9	5,6	0,6	4,5	0,7
TOTDESC	12,8	1,1	9,3	1,3	12,5	1,8	10,1	1,6
MARCHES TOT	27,3	2,2	20,9	2,2	27,3	3,4	21,8	2,8
R+Rp1	9,8	0,9	8,3	0,9	9,5	0,9	9,1	0,6
R+Rp2	10,0	0,5	9,5	0,6	9,2	1,0	9,2	1,1
R+Rp3	11,9	0,8	9,3	0,8	9,3	1,2	9,7	0,9
TOTRR	31,7	1,4	27,1	1,1	27,9	2,4	27,9	1,6
DEF1	0,6	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1	0,4	0,3
DEF2	0,1	0,1	0,5	0,3	0,5	0,3	0,1	0,1
DEF3	0,4	0,3	1,0	0,4	0,6	0,3	0,8	0,4
TOTDEF	1,1	0,4	1,9	0,6	1,3	0,6	1,3	0,6
TOIL1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0
TOIL2	0,5	0,2	0,6	0,2	0,8	0,3	0,7	0,2
TOIL3	0,4	0,2	0,4	0,2	0,6	0,3	0,3	0,1
TOTTOIL	0,9	0,3	1,3	0,3	1,4	0,4	1,0	0,3
LAT M1	24,8	5,6	33,8	6,2	22,8	3,8	39,8	9,3
LAT M5	74,1	10,4	102,9	10,9	71,9	12,7	99,5	14,9

Tableau 29: Expérience n°5A: Effets du mélange Transcutol / Tween80, en proportions variables (i.v. 60 mn avant le test), dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. N = 12 par lot.

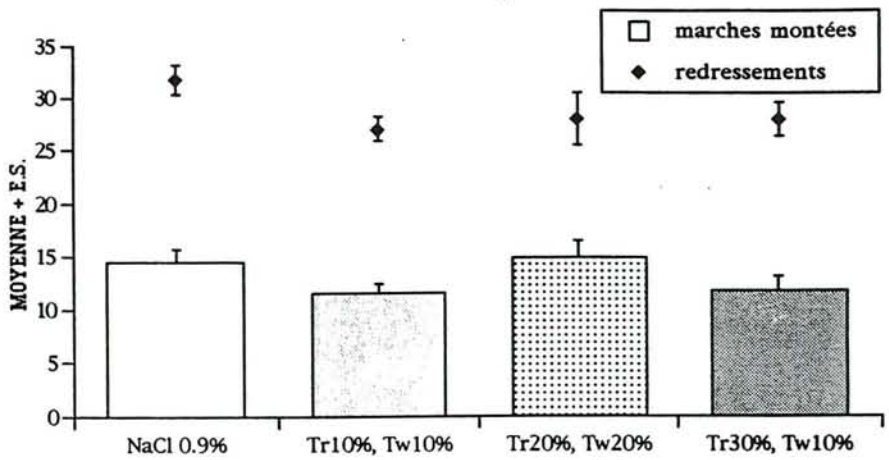


Figure 52: Expérience n°5A: Effets du mélange Transcutol / Tween80, en proportions variables (i.v. 60 mn avant le test), sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués, chez le rat Wistar.

- ASC1 : H = 4.29 ; N.S.
- ASC2 : H = 3.40 ; N.S.
- ASC3 : H = 0.91 ; N.S.
- TOTASC : H = 4.74 ; N.S.
- DESC1 : H = 3.37 ; N.S.
- DESC2 : H = 4.29 ; N.S.
- DESC3 : H = 2.07 ; N.S.
- TOTDESC : H = 3.04 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 4.48 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 1.85 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 1.72 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 5.42 ; N.S.
- TOTRR : H = 5.46 ; N.S.
- DEF1 : H = 2.56 ; N.S.
- DEF2 : H = 2.84 ; N.S.
- DEF3 : H = 1.91 ; N.S.
- TOTDEF : H = 1.48 ; N.S.
- TOIL1 : H = 6.41 ; N.S.
- TOIL2 : H = 0.13 ; N.S.
- TOIL3 : H = 0.09 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 1.58 ; N.S.
- LAT M1 : H = 5.03 ; N.S.
- LAT M5 : H = 4.74 ; N.S.

Le nombre total de marches montées et de redressements effectués n'est pas modifié d'une manière significative (Figure 52). Il apparaît que, comme on l'avait observé après 30 mn, le mélange Transcutol / Tween80 soit dépourvu d'effets sur les paramètres considérés dans le test de l'escalier, même à des dosages différents. Les résultats sont toutefois plus proches des témoins lorsque les injections sont réalisées 60 mn avant le test que lorsqu'elles sont réaliées 30 mn avant.

IV. DISCUSSION

La première conclusion qu'amène l'ensemble de ces résultats, est l'importance du choix du solvant d'injection. Celui-ci va déterminer la qualité des résultats expérimentaux. Si l'on ne vérifie pas au préalable qu'il est dépourvu d'effet propre sur les paramètres pris en compte, il est susceptible de masquer d'éventuels effets des produits testés dans les tests comportementaux.

L'observation de l'activité générale des animaux au cours de ces expériences, ainsi que les contraintes chimiques pour la dissolution des SLC à tester, nous ont incité à préférer le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10% et le traitement des animaux 1 h avant le test pour les expériences à suivre, afin d'éviter le plus d'interférences possible entre la substance testée et le solvant d'injection.

CHAPITRE 5

PROPRIETES ANXIOLYTIQUES ET ANTICONVULSIVANTES DU DIAZEPAM

TEMPS (min.)	TRAITEMENT			
	CONTROLE	DZP 1 mg/kg	DZP 2 mg/kg	DZP 3 mg/kg
N	8	8	7	8
15	4.3 ± 1.2	3.3 ± 1.4	3.6 ± 1.6	1.8 ± 1.0
30	6.6 ± 1.7	5.9 ± 1.6	5.3 ± 2.1	2.6 ± 1.5
45	8.6 ± 2.1	8.1 ± 2.2	7.1 ± 2.7	4.0 ± 2.3
60	10.9 ± 2.7	11.1 ± 2.5	9.2 ± 3.5	4.8 ± 2.8

Tableau 30: Expérience n°1B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

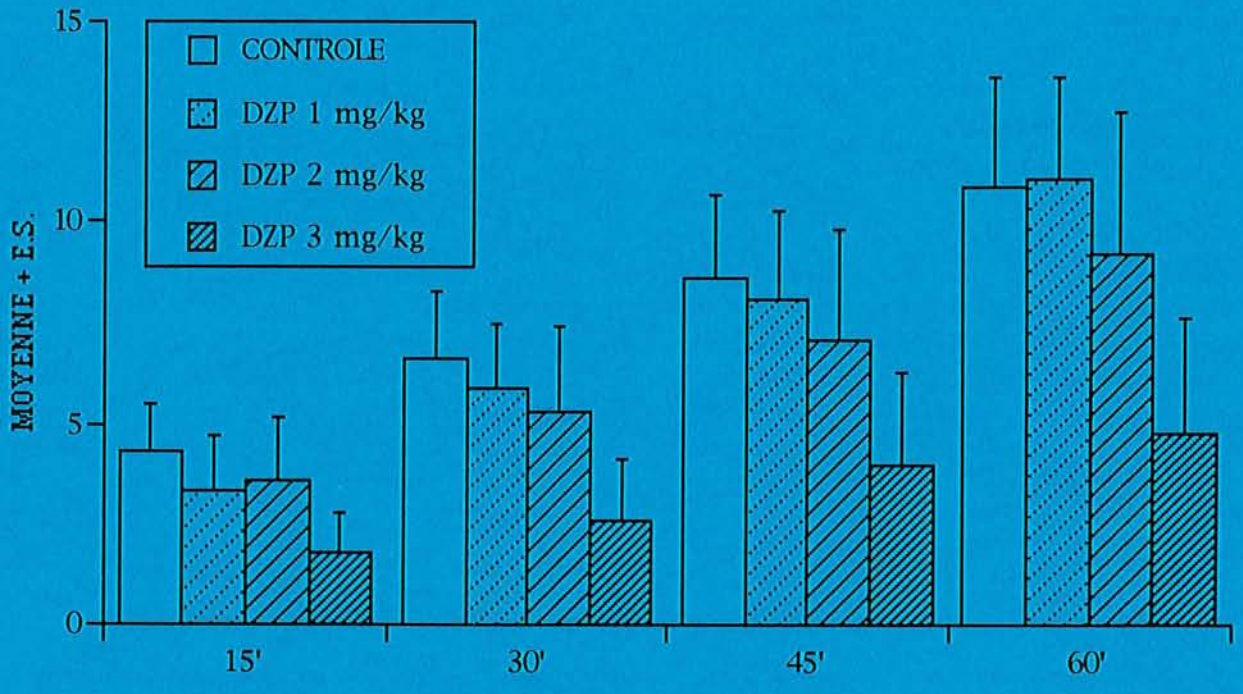


Figure 53: Expérience n°1B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON

A. Expérience n°1B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol à 10% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 31 rats mâles Wistar de 350-450 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Solution d'éthanol à 10% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 7) ;
    3 mg/kg (N = 8), en solution dans l'éthanol à 10%.

2. Résultats

Le tableau 30 présente les taux de boisson en ml en fonction du traitement. Aucune hétérogénéité n'a été mise en évidence par l'analyse des données par le test de Kruskal-Wallis (DDL = 3, N = 31) :

- 15 mn : H = 2.10 ; N.S.
- 30 mn : H = 2.92 ; N.S.
- 45 mn : H = 2.27 ; N.S.
- 60 mn : H = 3.21 ; N.S.

On remarque néanmoins que lorsqu'on augmente la concentration en DZP, on observe une diminution progressive du taux de boisson (Tableau 30, Figure 53). Cette diminution dose-dépendante du taux de boisson pourrait être due à un effet sédatif du traitement, favorisé par la présence d'éthanol dans la solution injectée.

A la dose de 1 mg de DZP par kg, on constate une très légère augmentation du taux de boisson après 60 mn d'observation (2.3% par rapport au lot contrôle). Toutefois, ces différences n'ont pas pu être démontrées statistiquement, probablement en raison de la grande variabilité interindividuelle. Il pourrait être intéressant de reproduire cette expérience avec des doses inférieures à 1 mg/kg. En effet, très souvent, il suffit d'une faible dose de BZD pour obtenir un effet anxiolytique notable.

TEMPS (min.)	TRAITEMENT			
	CONTROLE	DZP 1 mg/kg	DZP 2 mg/kg	DZP 3 mg/kg
N	8	8	8	8
15	1.9 ± 0.8	2.1 ± 1.3	4.3 ± 1.6	0.3 ± 0.3
30	2.1 ± 0.9	2.6 ± 1.6	4.9 ± 1.8	0.9 ± 0.9
45	3.3 ± 1.8	3.3 ± 1.7	6.6 ± 1.7	2.3 ± 1.5
60	3.4 ± 1.8	3.3 ± 1.7	7.2 ± 1.8	2.3 ± 1.5

Tableau 31: Expérience n°2B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

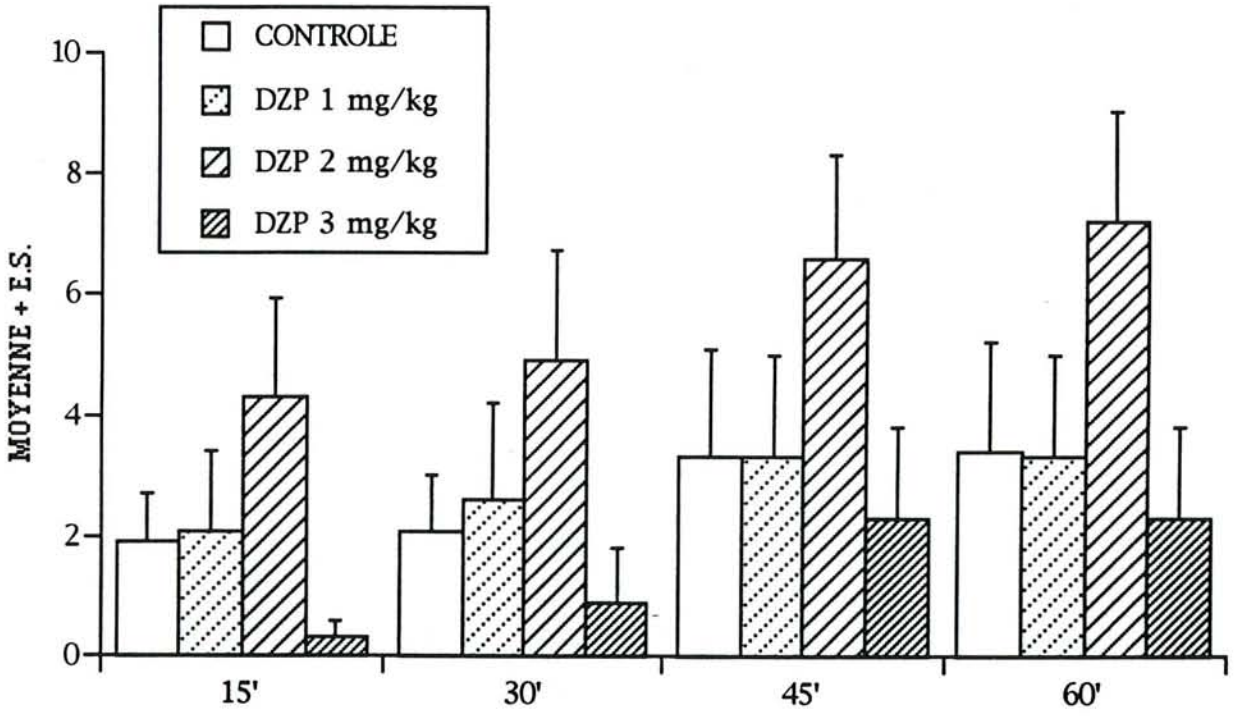


Figure 54: Expérience n°2B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

B. Expérience n°2B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats mâles Wistar de 200-250 g (IFFA-CREDO).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 8) ;
    3 mg/kg (N = 8), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Les taux de boisson relevés sont présentés dans le tableau 31, en fonction du traitement. Aucune hétérogénéité n'a pu être mise en évidence par l'analyse des données par le test de Kruskal-Wallis (DDL = 3, N = 32) :

- 15 mn : H = 5.28 ; N.S.
- 30 mn : H = 5.41 ; N.S.
- 45 mn : H = 4.16 ; N.S.
- 60 mn : H = 5.06 ; N.S.

Lorsqu'on dissout le DZP dans une solution de DMI à 25%, les résultats sont nettement différents de ceux obtenus dans l'expérience n°1B. La moyenne du taux de boisson est doublée à la dose de 2 mg de DZP par kg, par rapport au lot contrôle, quelle que soit la durée de l'expérimentation (Figure 54). Le lot traité avec 1 mg de DZP par kg montre des résultats semblables au lot contrôle. Par contre, avec 3 mg de DZP, on observe une diminution par rapport au lot contrôle (de 32 à 88% selon la durée d'observation) et également par rapport aux deux autres lots traités. Ces différences n'atteignent toutefois pas le niveau de significativité statistique en raison d'une forte variabilité interindividuelle.

Il semble donc qu'avec 1 mg de DZP par kg, le comportement du rat dans ce test ne soit pas significativement modifié et que cette dose soit insuffisante pour obtenir un effet anxiolytique. Avec 3 mg de DZP par kg, la diminution observée pourrait être dûe à l'apparition d'un effet sédatif de la BZD. Enfin, avec 2 mg de DZP par kg, il semble qu'avec des effectifs plus importants, un effet anxiolytique devrait être observable.

TEMPS (min.)	TRAITEMENT			
	CONTROLE	DZP 1 mg/kg	DZP 2 mg/kg	DZP 3 mg/kg
N	6	6	6	6
15	3.1 ± 0.5	4.1 ± 0.6	8.7 ± 4.0	4.1 ± 1.6
30	3.9 ± 0.8	5.4 ± 1.0	11.6 ± 3.3	9.8 ± 1.0 **
45	3.9 ± 0.8	6.1 ± 1.5	12.1 ± 3.0 *	10.6 ± 0.8 **
60	5.8 ± 1.4	6.8 ± 1.5	12.4 ± 2.9	11.6 ± 1.2 *

Tableau 32: Expérience n°3B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Long Evans. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (Test de Mann-Whitney).

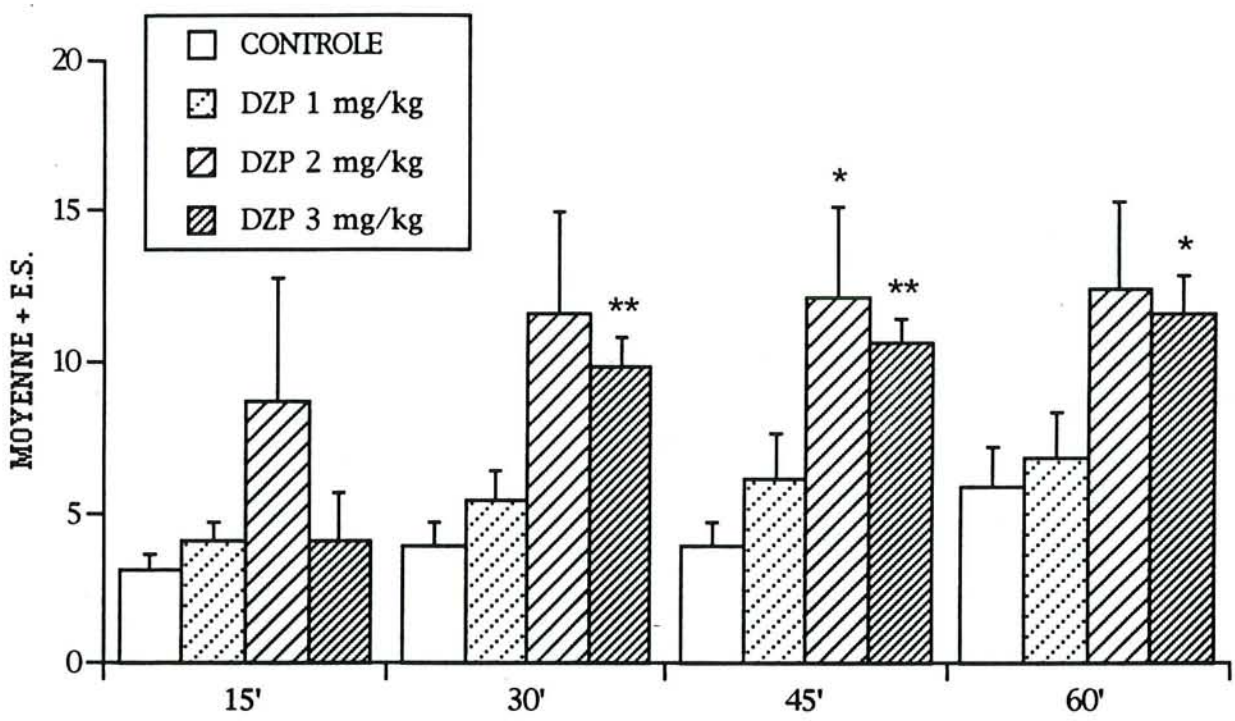


Figure 55: Expérience n°3B: Effet du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Long Evans. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (Test de Mann-Whitney).

En comparant ces résultats avec ceux de l'expérience n°1B, on remarque que les deux lots contrôles montrent des résultats très différents (Tableaux 30-31). Les rats contrôles ayant reçu une injection de DMI à 25% boivent deux à trois fois moins que ceux qui ont reçu l'éthanol à 10%. On pourrait donc envisager un léger effet anxiolytique de l'éthanol qui serait à l'origine de l'absence de différence entre le lot contrôle et les lots traités avec le DZP dans l'expérience n°1B.

C. Expérience n°3B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p., 30 mn avant le test) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Long-Evans

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 24 rats mâles Long-Evans de 230-330 g (JANVIER).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 6) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 6) ;
    2 mg/kg (N = 6) ;
    3 mg/kg (N = 6), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Les taux de boisson (Tableau 32) ont été analysés par le test de Kruskal-Wallis et montrent une hétérogénéité lorsque les relevés sont réalisés au bout de 30, 45 et 60 mn (DDL = 3, N = 24) :

- 15 mn : H = 1.13 ; N.S.
- 30 mn : H = 9.97 ; p = .02
- 45 mn : H = 11.72 ; p = .01
- 60 mn : H = 8.49 ; p = .04

A partir de 30 mn d'expérimentation, on obtient des différences statistiquement significatives aux deux doses supérieures (Figure 55). En effet, on n'observe pas de différence statistiquement significative entre le lot contrôle et le lot traité avec 1 mg de DZP par kg, cette dose apparaissant trop faible pour être efficace. Par contre, avec 2 mg de DZP par kg, le taux moyen de boisson est multiplié par deux ou par trois par rapport au lot contrôle, selon l'intervalle de temps considéré. Avec 3 mg de DZP par kg, on observe une augmentation de 30 à 170% par rapport au lot contrôle, selon l'intervalle de temps considéré, et donc une légère diminution par rapport au lot traité avec 2 mg de DZP par kg qui pourrait être liée à l'apparition d'un effet sédatif avec la dose la plus élevée. La diminution observée entre 2 et 3 mg n'est

cependant pas statistiquement significative. Par conséquent, un effet de type anxiolytique a été observé avec 2 et 3 mg de DZP par kg, si l'on admet que l'augmentation du taux d'une boisson nouvelle reflète un effet anxiolytique.

D. Discussion

Ce test place l'animal naïf et non traité face à un conflit entre son attirance pour une boisson sucrée et la néophobie déclenchée par cette boisson inconnue. Par conséquent, le rat normal présente un taux de boisson très faible (de 2 à 6 ml/h pour les lots contrôles ayant reçu une injection de DMI à 25%). Par contre, chez le rat traité avec une BZD, on observe un déplacement du conflit dans le sens de la préférence envers ce qui est bon, et d'une diminution simultanée de l'effet néophobique. Ce test semble donc constituer un test préliminaire efficace pour discriminer une activité de type BZD.

Le test de suppression néophobique de la prise de boisson nous a permis de mettre en évidence un effet anxiolytique du DZP à partir de 2 mg/kg chez le rat Long-Evans lorsque le solvant utilisé était le DMI. Mais l'emploi du DMI n'a pas abouti à la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique significatif chez le rat Wistar, qui semble constituer une souche plus sensible aux effets secondaires des véhicules d'injection que la souche Long-Evans. De même, l'utilisation d'éthanol à 10% pour solubiliser le DZP n'a pas permis de montrer un effet significatif du DZP chez le rat Wistar. La souche Long-Evans, qui est plus active que le rat Wistar, apparaît ainsi comme une souche plus appropriée pour le test de suppression néophobique de la prise de boisson.

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ

A. Expérience n°4B : Effet du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 6 rats mâles Wistar de 400-500 g (IFFA-CREDO) : Effet du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25%, sur les convulsions provoquées par le PTZ.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., à raison de 2 ml de solution par kg de poids corporel, 30 mn avant l'administration de PTZ. Ce dernier, administré à la

TRAITEMENT	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
CONTROLE 1	MOYENNE	4,5	2,2	29,5
	ES	0,2	0,7	4,0
DZP 1 mg/kg	MOYENNE	2,7 *	3,3	21,7
	ES	0,3	0,3	2,8
CONTROLE 2	MOYENNE	4,5	2,1	35,2
	ES	0,2	0,2	10,9
DZP 2 mg/kg	MOYENNE	0,5 * a	22,4	7,2
	ES	0,3	5,0	4,7

Tableau 33: Expérience n°4B: Effets du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité, la latence d'apparition et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle précédent; a: $p < .05$ par rapport à 1 mg/kg (test de Wilcoxon).

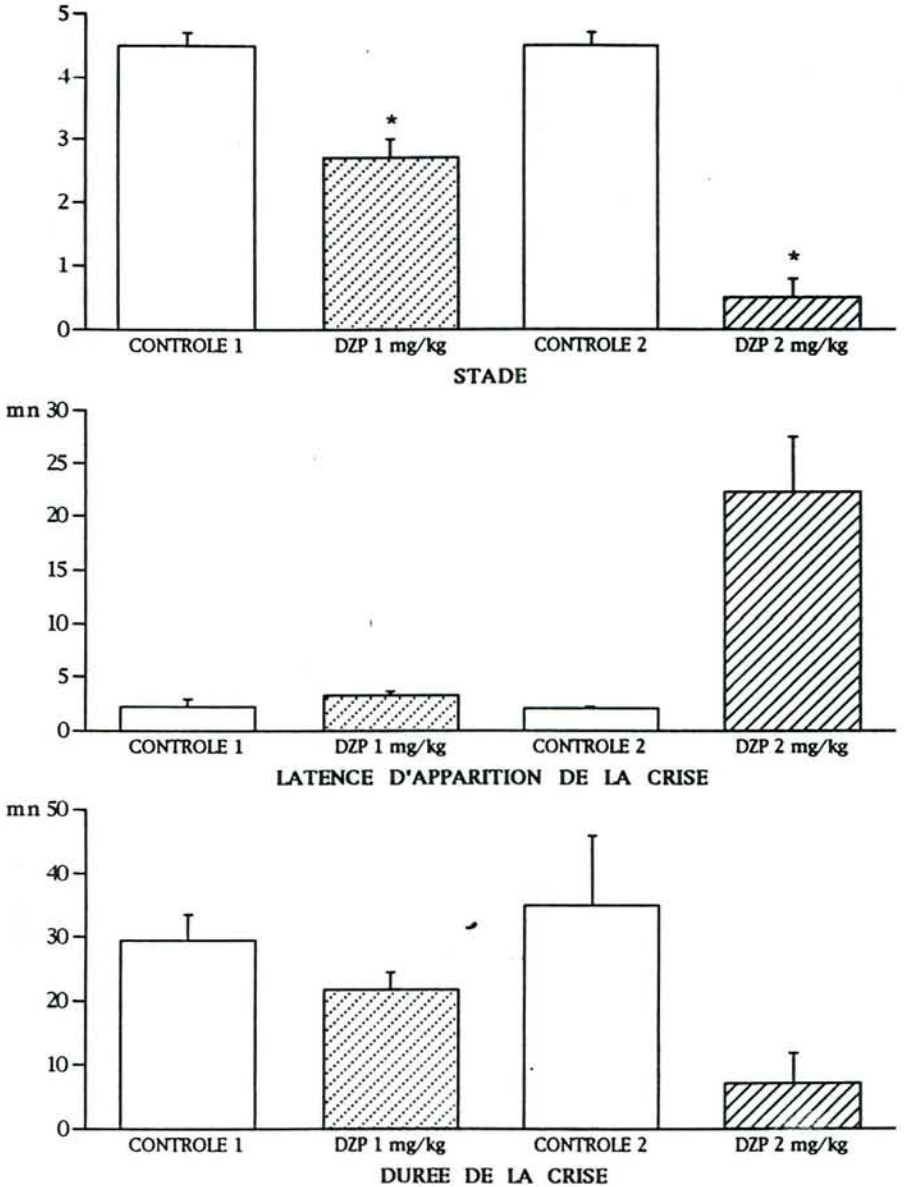


Figure 56: Expérience n°4B: Effets du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité (haut), la latence d'apparition (milieu) et la durée (bas) de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle précédent (test de Wilcoxon).

dose de 60 mg/kg de poids corporel, est dissous dans le NaCl 9‰ de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel :

* Tests de contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 6) ;
* Tests avec le DZP : 1 mg/kg (N = 6) ;
  2 mg/kg (N = 6), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Le Tableau 33 présente les résultats obtenus lors des 4 tests successifs., e test de Friedman a donné les résultats suivants (DDL = 3, N = 6) :

- Intensité de la crise : $Chi^2 = 16.16$; p = .002
- Latence d'apparition de la crise : $Chi^2 = 7.66$; NS
- Durée de la crise : $Chi^2 = 6.20$; NS

Il existe une hétérogénéité statistiquement significative des résultats obtenus, uniquement pour l'intensité des crises. Le test de Mann-Whitney a donc été appliqué uniquement à ce paramètre et a mis en évidence une diminution statistiquement significative de l'intensité des crises avec 1 et 2 mg/kg. Cette diminution est dose-dépendante, puisque le stade moyen observé avec 2 mg/kg est significativement différent de celui mesuré avec 1 mg/kg (Tableau 33, Figure 56). Dans les conditions de l'expérience, le DZP montre donc des effets anticonvulsivants à partir de 1 mg/kg. De plus, le DZP tend à augmenter d'une manière dose-dépendante, la latence d'apparition et à réduire la durée des crises comportementales. Ces effets ne sont toutefois pas statistiquement significatifs, en raison de la grande variabilité de ces deux paramètres.

Pendant la réalisation de cette expérience, nous avons constaté une légère perte de l'équilibre chez les animaux traités avec le DZP. Mais, ce déséquilibre s'atténuait fortement après l'injection de PTZ. Cet effet, lié au solvant, ne compromet en rien les résultats, puisque le rat n'a pas de mouvement particulier à réaliser et que nous observons uniquement le déroulement de la crise qui est indépendante de la volonté de l'animal. De plus, les comparaisons statistiques sont effectuées par rapport à des tests contrôles où les rats reçoivent la même quantité de DMI que dans les tests avec le DZP. Ainsi, dans ce test, l'emploi du DMI comme véhicule d'injection pour le DZP ne semble pas affecter la qualité des résultats.

Toutefois, lors des manipulations de mise au point du protocole, nous avons constaté que les seuls cas de décès observés l'étaient lorsque la première injection contenait de l'eau distillée et que la deuxième, 30 mn plus tard, contenait une dose de PTZ équivalent à 60 mg/kg. Par contre, lorsque la première injection était remplacée

TRAITEMENT	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
CONTROLE 1	MOYENNE	4,5	2,2	14,0
	ES	0,2	0,2	4,4
DZP 0.5 mg/kg	MOYENNE	3,5 *	3,8	21,0
	ES	0,4	1,6	3,4
CONTROLE 2	MOYENNE	4,5	3,9	30,6
	ES	0,2	1,2	7,9
DZP 1 mg/kg	MOYENNE	3,0 *	2,4	23,3
	ES	0,3	0,2	2,1
CONTROLE 3	MOYENNE	4,8	3,5	41,1 c
	ES	0,2	1,8	8,8
DZP 2 mg/kg	MOYENNE	1,4 * a,b	13,8	11,5 * b
	ES	0,4	4,8	4,3

Tableau 34: Expérience n°5B: Effets du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité, la latence d'apparition et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle précédent; a: $p < .05$ par rapport à 0.5 mg/kg; b: $p < .05$ par rapport à 1 mg/kg; c: $p < .05$ par rapport au contrôle 1 (test de Wilcoxon).

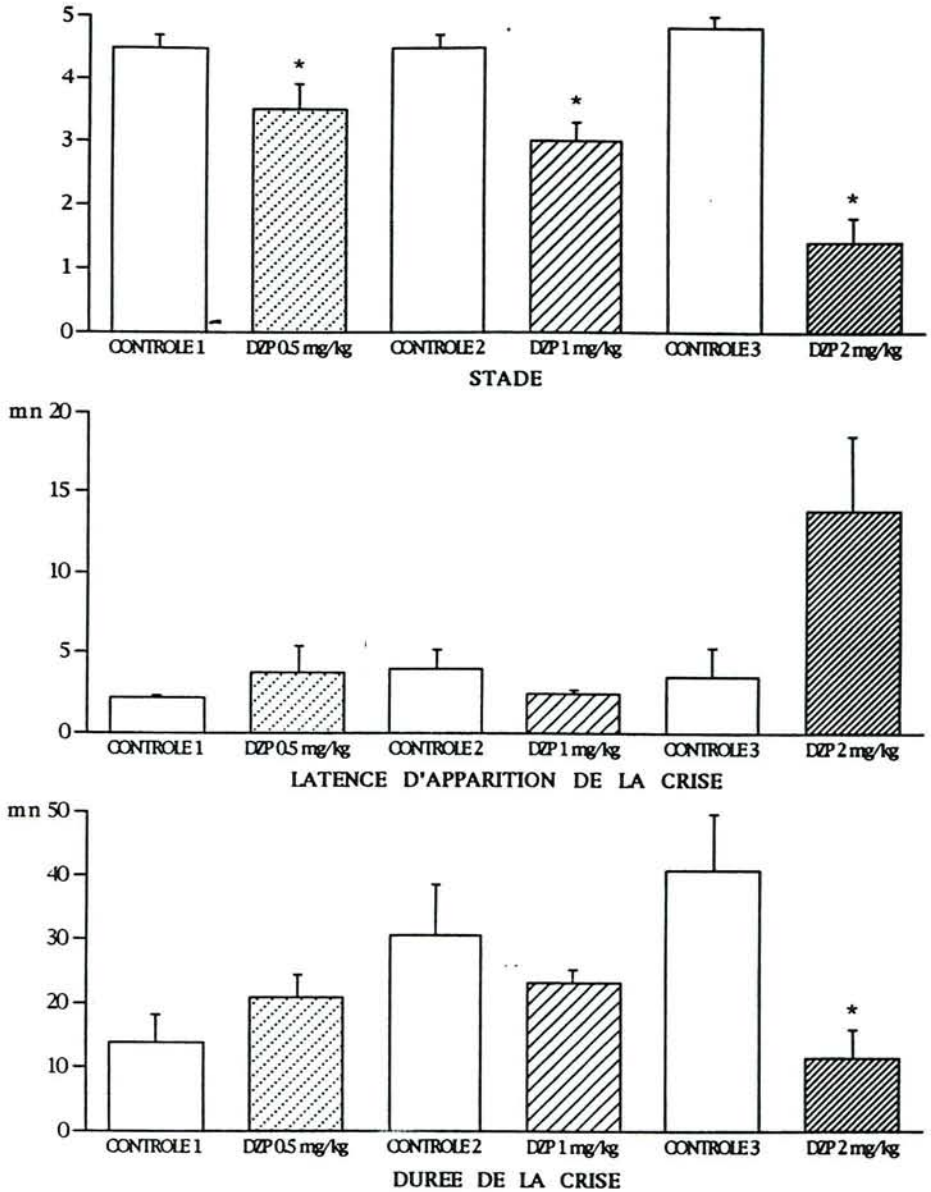


Figure 57: Expérience n°5B: Effets du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité (haut), la latence d'apparition (milieu) et la durée (bas) de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle précédent (test de Wilcoxon).

par une solution de DMI à 25%, aucun cas de décès n'a été observé avec 60 mg de PTZ par kg. Ces rats effectuaient pourtant des crises allant du stade 3 au stade 5, tout comme le lot recevant l'eau distillée puis le PTZ. Lorsqu'un rat traité à l'eau distillée puis au PTZ effectuait une crise de stade 5, celle-ci était, dans tous les essais effectués (8 rats Wistar), interrompue par la mort de l'animal. Ces résultats semblent indiquer que le DMI diminue l'intensité de la crise comportementale ou que, tout au moins, il protège le rat en crise de stade 5 contre la mort. Ainsi, pour pouvoir utiliser le même lot de rats tout au long d'une expérience (afin d'augmenter l'homogénéité des résultats), limiter le nombre de décès et mesurer l'effet de différentes dosages, il semble préférable, soit de diminuer la dose de PTZ injectée, soit d'utiliser le DMI comme véhicule d'injection.

B. Expérience n°5B : Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 8 rats mâles Wistar de 300-400 g (IFFA-CREDO) : Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25%, sur les convulsions provoquées par le PTZ.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., à raison de 2 ml de solution par kg de poids corporel, 30 mn avant l'administration de PTZ. Ce dernier, administré à la dose de 60 mg/kg de poids corporel, est dissous dans le NaCl 9‰ de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel :
  * Tests de contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 8) ;
  * Tests avec le DZP : 0.5 mg/kg (N = 8) ;
    1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 5), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Afin de vérifier les résultats obtenus dans l'expérience précédente et d'élargir l'éventail de doses de DZP testées, nous avons reproduit le même protocole sur un lot de 8 rats plus jeunes, et sans sélection préliminaire des rats sensibles au PTZ. En effet, l'analyse des résultats obtenus lors du premier test de contrôle (DMI à 25% puis PTZ à 60 mg/kg) avec ce lot de 8 rats, a montré que la moyenne des stades des crises était de 4,5 par rapport à l'échelle de Racine et que le stade minimal observé était le stade 4 (Tableau 34). C'est pourquoi, il nous a semblé inutile de présélectionner les rats, la population de départ présentant des résultats suffisamment homogènes et des intensités de crises suffisamment élevées pour

pouvoir mettre en évidence l'effet anticonvulsivant du DZP. Ceci permet d'éviter le biais apporté par la présélection des rats.

En fait, le faible nombre de crises complètes obtenu lors des présélections de l'expérience n°4B était probablement dû au poids trop élevé des animaux. A partir d'un certain poids corporel, l'injection par voie i.p. devient plus hasardeuse en raison de la couche de tissu adipeux présente sous la peau. Si l'injection est effectuée dans cette couche, la substance diffuse moins rapidement et sa concentration sanguine s'en trouve diminuée. Dans l'expérience n°4B, la probabilité d'injecter la solution dans le tissu adipeux était très élevée. C'est probablement pour cette raison que nous n'avons sélectionné que 6 rats très sensibles au PTZ.

L'analyse par le test de Friedman montre une hétérogénéité de l'intensité et de la durée des crises (DDL = 5, N = 5) :

- Intensité de la crise : $Chi^2 = 29.74$; $p = .0001$
- Latence d'apparition de la crise : $Chi^2 = 10.21$; NS
- Durée de la crise : $Chi^2 = 12.86$; $p = .025$

En ce qui concerne les différents tests de contrôle, l'intensité et la latence d'apparition des convulsions reste stable. Seul le contrôle 3 montre une augmentation de la durée des crises par rapport au contrôle 1 (Tableau 34).

Le DZP induit une diminution statistiquement significative de l'intensité des crises à partir de 0.5 mg/kg, cet effet s'accentuant avec 2 mg/kg (Tableau 34). En effet, les deux doses inférieures de DZP (0.5 et 1 mg/kg) produisent des effets similaires. Par contre, la dose la plus élevée (2 mg/kg) produit une inhibition statistiquement plus élevée que les deux premières (Tableau 34). La durée des crises n'est diminuée d'une manière statistiquement significative qu'à partir de 2 mg/kg, elle tendrait même à augmenter avec 0.5 mg/kg (Figure 57). La dose de 2 mg de DZP par kg tend à augmenter la latence d'apparition des crises comportementales, sans atteindre le niveau de significativité statistique. Lors du contrôle 3, trois animaux sont décédés pendant la crise. Le test avec 2 mg de DZP par kg a donc été réalisé avec 5 rats au lieu de 8 pour les tests précédents. La non significativité de l'augmentation de la latence avec 2 mg/kg est peut-être liée à cette diminution de l'effectif.

Les conditions expérimentales ont donc permis de mettre en évidence, sans présélection des animaux sensibles au PTZ, un effet anticonvulsivant du DZP à partir de 0.5 mg/kg, cet effet étant dose-dépendant.

TRAITEMENT	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
CONTROLE 1	MOYENNE	4,6	1,7	4,6
	ES	0,2	0,1	0,4
DZP 0.5 mg/kg	MOYENNE	3,1 *	5,5 *	22,6 **
	ES	0,5	2,8	5,1
CONTROLE 2	MOYENNE	4,5	1,8	21,9 b
	ES	0,2	0,3	4,8
DZP 1 mg/kg	MOYENNE	2,4 **	8,5 **	15,1
	ES	0,4	3,6	4,0
CONTROLE 3	MOYENNE	3,9	4,8	23,7 b
	ES	0,5	2,8	3,6
DZP 2 mg/kg	MOYENNE	1,7 * a	11,9	20,2
	ES	0,3	3,3	3,5

Tableau 35: Expérience n°6B: Effets du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité, la latence d'apparition et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Long-Evans. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle précédent; a: $p < .05$ par rapport à 0.5 mg/kg; b: $p < .01$ par rapport au contrôle 1 (test de Wilcoxon).

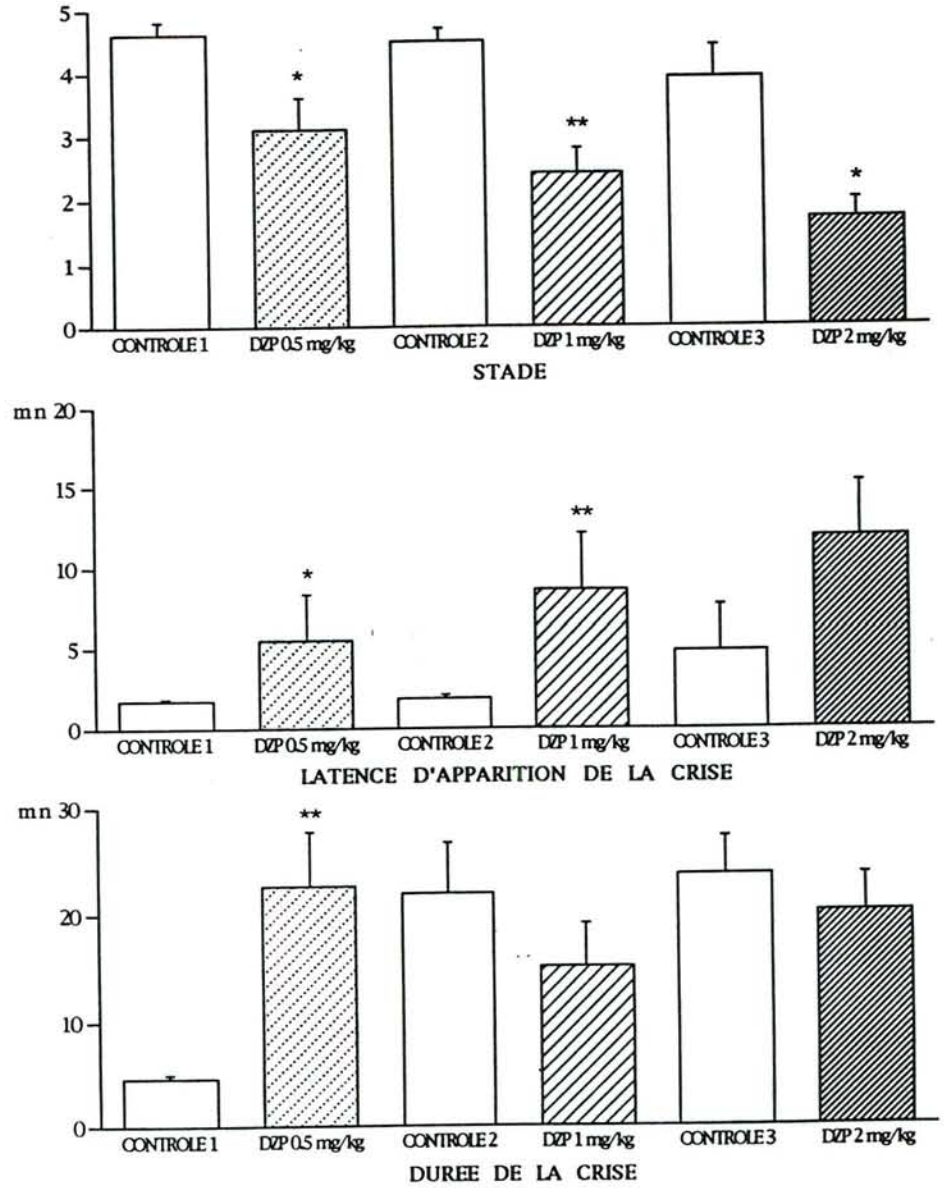


Figure 58: Expérience n°6B: Effets du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI, sur l'intensité (haut), la latence d'apparition (milieu) et la durée (bas) de la crise comportementale induite par le PTZ (60 mg/kg), chez le rat Long-Evans. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle précédent (test de Wilcoxon).

C. Expérience n°6B : Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25% chez le rat Long-Evans

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 10 rats mâles Long-Evans de 250-450 g (JANVIER) : Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI à 25%, sur les convulsions provoquées par le PTZ.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., à raison de 2 ml de solution par kg de poids corporel, 30 mn avant l'administration de PTZ. Ce dernier, administré à la dose de 60 mg/kg de poids corporel, est dissous dans le NaCl 9‰ de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel :
  * Tests de contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 10) ;
  * Tests avec le DZP : 0.5 mg/kg (N = 10) ;
    1 mg/kg (N = 10) ;
    2 mg/kg (N = 10), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Afin de valider les résultats obtenus avec la souche Wistar chez une autre souche de rat, nous avons reproduit le même protocole avec 10 rats Long-Evans. Le profil des crises obtenues lors du premier test de contrôle (Contrôle 1) est le même que celui des rats Wistar (Expérience n°5B), mis à part la durée des crises qui est environ trois fois plus courte chez les rats Long-Evans (Tableaux 34-35).

Le test de Friedman montre qu'il existe des différences statistiquement significatives entre les tests, pour les trois paramètres observés (DDL = 5, N = 10) :

- Intensité de la crise : $Chi^2 = 34.25$; $p = .0001$
- Latence d'apparition de la crise : $Chi^2 = 23.09$; $p = .0003$
- Durée de la crise : $Chi^2 = 15.32$; $p = .01$

En ce qui concerne l'ensemble des tests contrôles, la durée des crises varie : lors des contrôles 2 et 3, la durée des crises est nettement plus élevée que lors du premier contrôle (Tableau 35).

Le DZP produit une diminution statistiquement significative de l'intensité des crises aux trois doses testées et cet effet évolue d'une manière dose-dépendante

(Figure 58). De plus, le DZP augmente la latence d'apparition des crises aux trois doses, mais en raison d'une grande variabilité de ce paramètre, l'augmentation est significative du point de vue statistique uniquement avec 0.5 et 1 mg/kg. La durée des crises est également modifiée par le DZP : la plus faible dose augmente significativement la durée des crises, alors que les deux autres tendent à la réduire, sans atteindre toutefois un niveau significatif. L'effet du DZP sur la durée n'évolue donc pas d'une manière dose-dépendante. Or, comme nous l'avons remarqué ci-dessus, ce paramètre n'est pas stable au cours des différents contrôles. Les résultats observés avec le DZP ne peuvent donc pas être retenus en ce qui concerne ce paramètre.

En comparant ces résultats avec ceux obtenus chez le rat Wistar (Expérience n°5B), il est intéressant de noter que la latence d'apparition des crises est très nettement modifiée par le DZP chez le rat Long-Evans (dans le sens d'une augmentation), alors que cette augmentation n'a pas pu être démontrée de façon statistiquement significative chez le rat Wistar (Figures 57-58). Les expériences n°5B et 6B nous permettent donc de conclure que le DZP, dissous dans le DMI à 25%, diminue l'intensité des crises induites par le PTZ (60 mg/kg) de façon statistiquement significative et dose-dépendante, et ceci même avec la dose la plus faible (0.5 mg/kg).

D. Discussion

Quelle que soit la souche de rat employée, nous avons obtenu sensiblement le même profil d'activité pour le DZP, c'est-à-dire diminution dose-dépendante de l'intensité, augmentation de la latence d'apparition et diminution de la durée de la crise comportementale. Ces modifications ne sont pas toujours statistiquement significatives dans le cas de la latence et de la durée. Une augmentation significative de la durée a même été observée avec 0.5 mg de DZP par kg de poids corporel, chez le rat Long-Evans (Figure 58). Ces fluctuations sont probablement liées à la très grande variabilité inter- et intra-individuelle de ces deux paramètres. Par conséquent, le paramètre qui semble le plus fiable est l'intensité des crises. Ces observations sont en accord avec celles que l'on peut retrouver dans la littérature (ex : Schwark & Löscher, 1985). L'intensité des crises est le critère le plus fréquemment utilisé et est considéré comme le plus fiable pour la mesure de l'inhibition des crises comportementales. En effet, dans nos expériences, c'est le seul paramètre qui montre une courbe dose-dépendante satisfaisante.

N° LOT	A+B+C		A				B				C			
N° PASSAGE	1		1		2		1		2		1		2	
TRAITEMENT	SANS		SANS		CONTROLE		SANS		DZP 1 mg/kg		SANS		DZP 2 mg/kg	
N	21		10		10		8		8		3		3	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
TPS CENTRE	42,2	5,5	42,0	8,6	33,9	9,7	50,9	8,5	17,0	12,7	19,7	5,2	1,3	0,9
TPS FER	244,1	7,4	241,6	12,8	259,6	12,5	237,6	9,8	281,1	14,1	270,0	10,1	298,7	0,9
TPS OUV	13,7	3,1	16,4	5,7	6,5	3,4	11,5	3,7	1,9	1,5	10,3	5,4	0,0	0,0
%TPS CENTRE	14,1	1,8	14,0	2,9	11,3	3,2	17,0	2,8	5,7	4,2	6,6	1,7	0,4	0,3
%TPS FER	81,4	2,5	80,5	4,3	86,5	4,2	79,2	3,3	93,7	4,7	90,0	3,4	99,6	0,3
% TPS OUV	4,6	1,0	5,5	1,9	2,2	1,1	3,8	1,2	0,6	0,5	3,4	1,8	0,0	0,0
NB ENT FER	9,5	0,7	9,4	1,4	8,3	1,4	9,6	0,9	4,3 *	1,9	9,3	1,2	1,7	0,7
NB ENT OUV	1,3	0,3	1,5	0,5	0,6	0,3	1,1	0,4	0,5	0,4	1,3	0,7	0,0	0,0
NB TOT ENT	10,8	0,9	10,9	1,7	8,9	1,7	10,8	1,0	4,8	2,2	10,7	0,9	1,7	0,7
% NB ENT FER	88,9	2,2	88,6	3,7	96,1	2,1	90,1	3,1	96,6	2,2	87,0	6,7	100,0	0,0
% NB ENT OUV	11,1	2,2	11,4	3,7	3,9	2,1	9,9	3,1	3,4	2,2	13,0	6,7	0,0	0,0
TOT RED	17,6	0,9	18,1	1,2	10,7 *	1,8	16,8	1,8	4,0 *	1,4	18,3	2,0	0,3	0,3
TOT TOIL	1,6	0,3	1,3	0,4	1,5	0,4	1,9	0,4	1,9	0,7	2,0	1,5	0,3	0,3
TOT DEF	0,4	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	0,0
LAT SORTIE	34,8	15,0	41,6	28,7	10,6	1,6	36,1	[illegible]	120,4	52,6	8,7	2,8	201,3	98,7
LAT ENT OUV1	189,9	22,6	201,6	28,9	234,1	33,9	190,1	[illegible]	241,5	39,7	150,0	81,7	300,0	0,0
TPS OUV1	5,7	1,2	6,2	2,1	3,5	1,8	5,8	2,0	0,8	0,5	4,0	2,1	0,0	0,0
LAT EXTR OUV1	236,7	19,9	228,0	30,5	257,5	28,7	244,4	33,7	300,0	0,0	245,0	55,0	300,0	0,0

Tableau 36: Expérience n°7B: Comparaison entre un premier passage sans traitement et un deuxième passage avec traitement (DZP 0-2 mg/kg, en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, i.p. 30 mn avant le deuxième passage) dans le labyrinthe en croix surélevé, chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au premier passage (test de Wilcoxon). Les résultats du premier passage sont présentés pour l'ensemble des rats (première colonne) et par lot (A, B ou C).

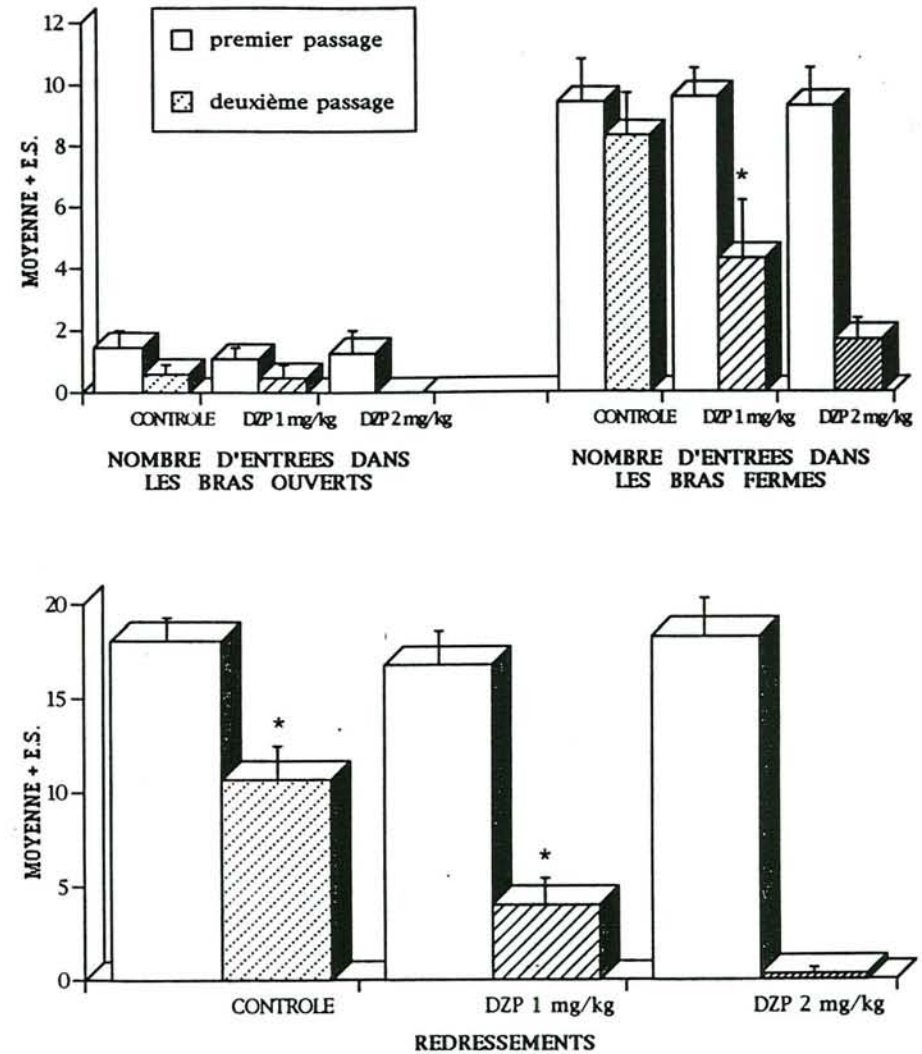


Figure 59: Expérience n°7B: Influence d'un premier passage sans traitement sur les effets du DZP (0-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le deuxième passage) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% dans le labyrinthe en croix surélevé, chez le rat Wistar: Comparaison du nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts et fermés (haut), et du nombre de redressements effectués (bas) lors des deux passages. *: $p < .05$ par rapport au premier passage (test de Wilcoxon).

III. TEST DU LABYRINTHE EN CROIX SURELEVE

A. Expérience n°7B : Effet d'un premier passage dans le dispositif sans traitement, 100 mn avant le deuxième passage avec traitement par le DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le deuxième passage)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 21 rats femelles Wistar de 250-350 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le deuxième passage dans le labyrinthe :
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 10, lot A) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8, lot B) ;
    2 mg/kg (N = 3, lot C), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Aucun redressement, ni toilettage, ni défécation n'a été relevé dans les bras ouverts du labyrinthe, les résultats concernant ces trois paramètres n'ont donc pas été séparés pour les deux types de bras.

Les lots A, B et C auxquels ont été attribués les trois différents traitements au deuxième passage ont été comparés en ce qui concerne le premier passage sans traitement (Test de Kruskal-Wallis). Aucun paramètre n'a montré de différence statistiquement significative, ces trois lots pouvaient donc être considérés comme équivalents lors du premier passage.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus avec le lot A (lot contrôle) lors des deux passages, on obtient une différence statistiquement significative, uniquement pour les redressements (Tableau 36). En effet, lors du deuxième passage, les rats traités avec le véhicule seul effectuent statistiquement moins de redressements que pendant le premier passage sans traitement (Figure 59). D'une manière plus générale, les rats du lot A semblent moins actifs lors du deuxième passage et montrent une préférence plus marquée pour les bras fermés que lors du premier passage, ces tendances étant toutefois non significatives.

En ce qui concerne les résultats du deuxième passage (Tableau 37), le test de Kruskal-Wallis met en évidence une hétérogénéité pour les paramètres suivants (DDL = 2, N = 21) :

PARAMETRE	TRAITEMENT		
	CONTROLE (moyenne ± E.S.)	DZP 1 mg/kg (moyenne ± E.S.)	DZP 2 mg/kg (moyenne ± E.S.)
TPS CENTRE	33.9 ± 9.7	17.0 ± 12.7	1.3 ± 0.9 *
TPS FER	259.6 ± 12.5	281.1 ± 14.1	298.7 ± 0.9 *
TPS OUV	6.5 ± 3.4	1.9 ± 1.5	0.0 ± 0.0
% TPS CENTRE	11.3 ± 3.2	5.7 ± 4.2	0.4 ± 0.3 *
% TPS FER	86.5 ± 4.2	93.7 ± 4.7	99.6 ± 0.3 *
% TPS OUV	2.2 ± 1.1	0.6 ± 0.5	0.0 ± 0.0
NB ENT FER	8.3 ± 1.4	4.3 ± 1.9 *	1.7 ± 0.7 *
NB ENT OUV	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.0 ± 0.0
NB TOT ENT	8.9 ± 1.7	4.8 ± 2.2	1.7 ± 0.7 *
% NB ENT FER	96.1 ± 2.1	96.6 ± 2.2	100.0 ± 0.0
% NB ENT OUV	3.9 ± 2.1	3.4 ± 2.2	0.0 ± 0.0
TOT RED	10.7 ± 1.8	4.0 ± 1.4 **	0.3 ± 0.3 *
TOT TOIL	1.5 ± 0.4	1.9 ± 0.7	0.3 ± 0.3
TOT DEF	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
LAT SORTIE	10.6 ± 1.6	120.4 ± 52.6	201.3 ± 98.7
LAT ENT OUV1	234.1 ± 33.9	241.5 ± 39.7	300.0 ± 0.0
TPS OUV1	3.5 ± 1.8	0.8 ± 0.5	0.0 ± 0.0
LAT EXTR OUV1	257.5 ± 28.7	300.0 ± 0.0	300.0 ± 0.0
N	10	8	3

Tableau 37: Expérience n°7B: Effets du DZP (0-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le deuxième passage) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, dans le labyrinthe en croix surélevé après un premier passage sans traitement, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

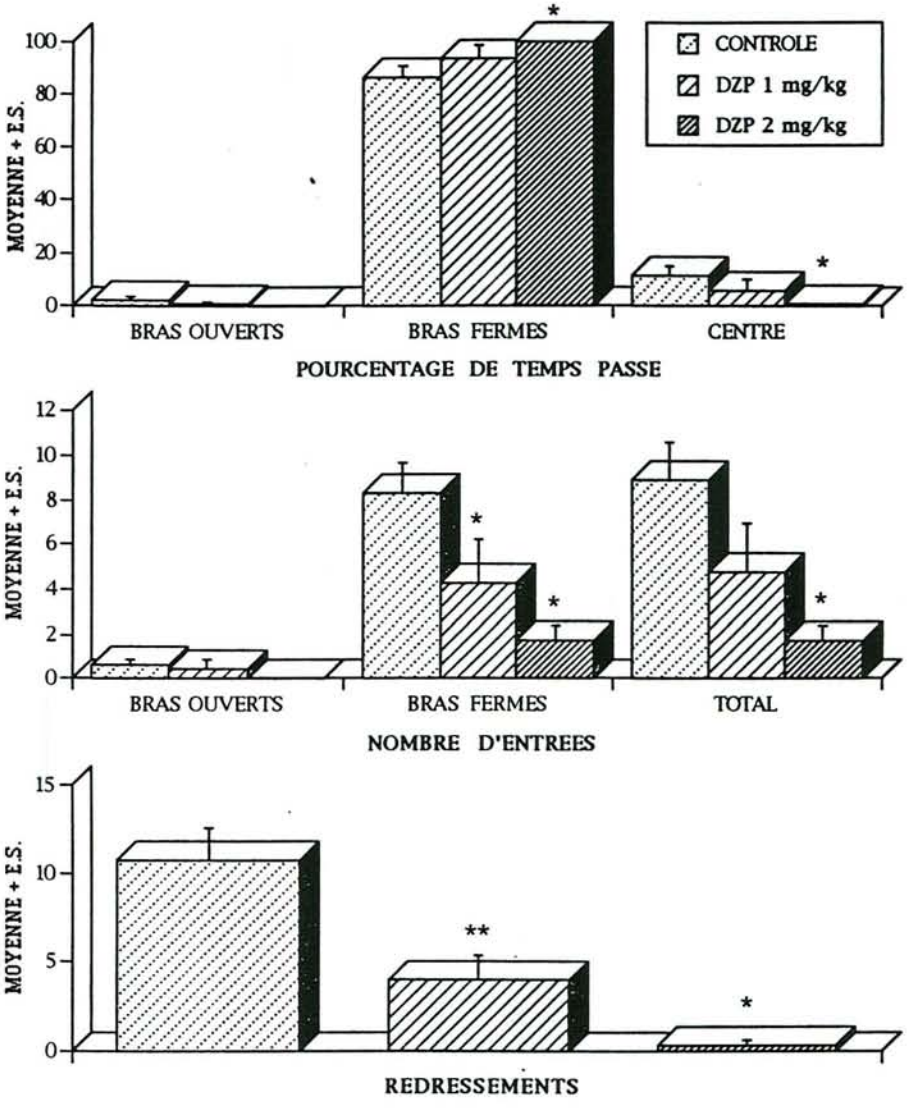


Figure 60: Expérience n°7B: Effets du DZP (1-2 mg/kg, i.p. 30 mn avant le deuxième passage) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, sur le pourcentage de temps passé dans les différentes parties du labyrinthe en croix surélevé (haut), sur le nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts et fermés (milieu) et sur le nombre de redressements effectués (bas), après un premier passage sans traitement, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

- TPS CENTRE : H = 6.50 ; p = .0388
- TPS FER : H = 6.49 ; p = .0389
- TPS OUV : H = 1.32 ; N.S.
- %TPS CENTRE : H = 6.50 ; p = .0388
- %TPS FER : H = 6.49 ; p = .0389
- %TPS OUV : H = 1.32 ; N.S.
- NB ENT FER : H = 7.14 ; p = .0282
- NB ENT OUV : H = 1.08 ; N.S.
- NB TOT ENT : H = 6.66 ; p = .0359
- %NB ENT FER : H = 1.07 ; N.S.
- %NB ENT OUV : H = 1.07 ; N.S.
- TOT RED : H = 11.40 ; p = .0033
- TOT TOIL : H = 2.80 ; N.S.
- TOT DEF : H = 1.10 ; N.S.
- LAT SORTIE : H = 2.47 ; N.S.
- LAT ENT OUV1 : H = 1.07 ; N.S.
- TPS OUV1 : H = 1.32 ; N.S.
- LAT EXTR OUV1 : H = 2.31 ; N.S.

Les lots traités avec le DZP (lots B et C) montrent, par rapport au lot contrôle, une augmentation dose-dépendante de la préférence pour les bras fermés, une diminution du nombre d'entrées dans les bras fermés, du nombre total d'entrées dans les bras et du nombre de redressements effectués (Figure 60). De plus, contrairement au lot contrôle, aucun des rats traités avec le DZP n'atteint l'extrémité d'un bras ouvert pendant la durée du test. En d'autres termes, le DZP provoque une augmentation de la préférence pour les bras fermés, ce qui pourrait correspondre à un effet de type anxiogène. Toutefois, cet effet s'accompagnant d'une diminution significative des activités locomotrice et exploratrice avec 2 mg/kg, il s'agirait plutôt d'un effet de type sédatif. File (1990) a montré que lors d'un deuxième passage dans le labyrinthe, les scores du lot contrôle n'étaient pas modifiés, mais que les scores des rats traités avec le CDP l'étaient et ne présentaient plus de différences avec le lot contrôle. File (1990) en a conclu qu'une seule expérience préliminaire dans le labyrinthe, avec ou sans traitement, suffisait pour provoquer une tolérance aux effets anxiolytiques du CDP. Les résultats que nous avons obtenus, vont dans le sens des observations de File (1990). En effet, les rats traités avec le DZP lors du deuxième passage ne montrent pas un profil de type anxiolytique, mais plutôt un profil de type sédatif, en particulier avec 2 mg/kg.

B. Expérience n°8B : Effet du DZP (0.25-1 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 28 rats femelles Wistar de 200-250 g (élevage du laboratoire).

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le passage dans l'enceinte inconnue et 35 mn avant le passage dans le labyrinthe :
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 7) ;

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.25 mg/kg		DZP 0.5 mg/kg		DZP 1 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
TPS CENTRE	84,4	13,8	76,9	10,2	58,6	10,9	46,7	8,8
TPS FER	192,6	18,2	194,3	14,5	197,0	22,2	212,3	13,1
TPS OUV	23,0	10,1	28,9	6,7	44,4	12,2	41,0	8,6
%TPS CENTRE	28,1	4,6	25,6	3,4	19,5	3,6	15,6	2,9
%TPS FER	64,2	6,1	64,8	4,8	65,7	7,4	70,8	4,4
% TPS OUV	7,7	3,4	9,6	2,2	14,8	4,1	13,7	2,9
NB ENT FER	10,0	1,1	8,1	1,1	6,7	1,7	6,0	1,6
NB ENT OUV	1,4	0,4	2,9	0,6	3,3	1,0	3,1	0,8
NB TOT ENT	11,4	1,6	11,0	1,4	10,0	2,6	9,1	2,1
%NB ENT FER	89,3	3,4	73,1 *	5,8	71,3 *	6,5	65,4 **	6,1
%NB ENT OUV	10,7	3,4	26,9 *	5,8	28,7 *	6,5	34,6 **	6,1
RED FER	12,4	0,9	6,7 **	0,9	5,9 **	1,4	4,6 **	0,9
TOTRED	12,4	0,9	6,7 **	0,9	5,9 **	1,4	4,6 **	0,9
TOIL FER	1,0	0,4	0,9	0,3	0,7	0,4	0,7	0,3
TOTTOIL	1,0	0,4	0,9	0,3	0,7	0,4	0,7	0,3
DEF OUV	0,1	0,1	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTDEF	0,1	0,1	0,4	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
MIC FER	0,3	0,2	0,1	0,1	0,6	0,3	0,3	0,2
MIC OUV	0,1	0,1	0,6	0,2	0,3	0,2	1,0	0,5
TOTMIC	0,4	0,3	0,7	0,3	0,9	0,4	1,3	0,6
LAT SORTIE	19,4	5,1	10,9	1,9	28,6	7,9	17,0	2,2
LAT ENT OUV1	131,1	46,9	61,3	41,0	60,0	40,9	29,6	17,3
TPS OUV1	14,7	5,6	7,3	2,1	12,3	4,5	16,0	2,7
LAT EXTR OUV1	177,0	46,2	166,6	50,6	121,7	47,6	155,0	45,8

Tableau 38: Expérience n°8B: Effets du DZP (0-1 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% dans le labyrinthe en croix surélevé, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

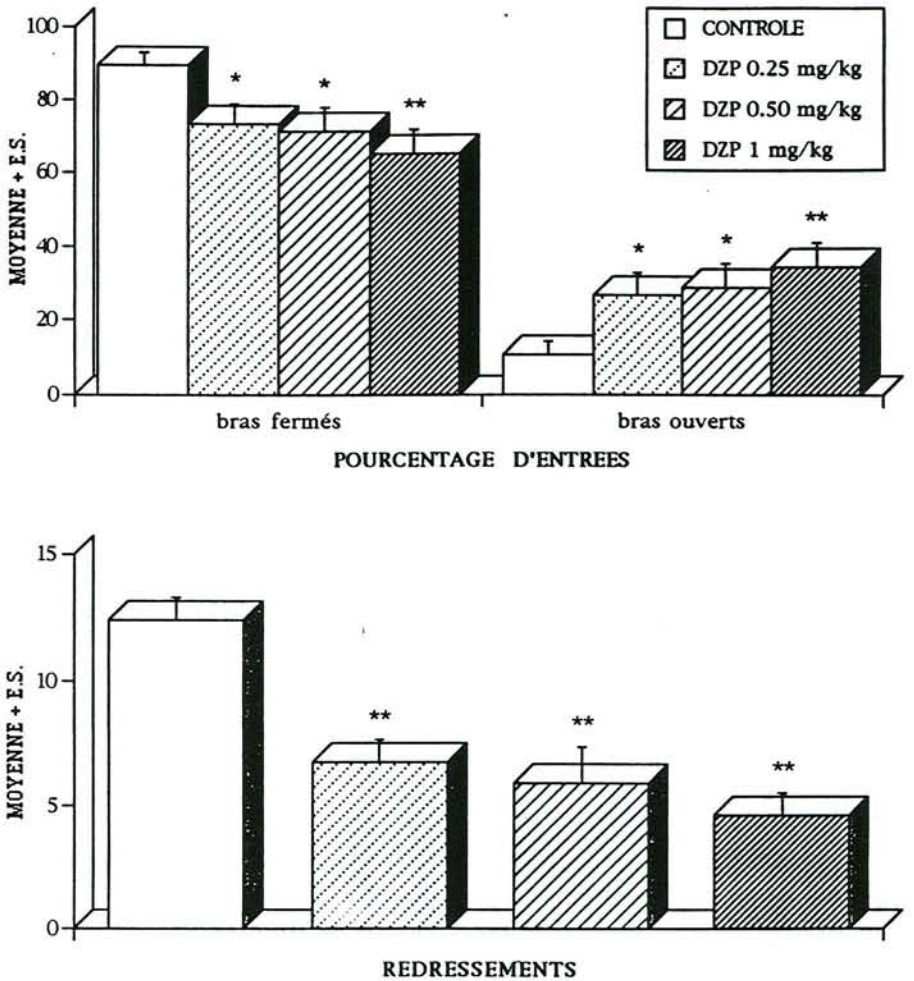


Figure 61: Expérience n°8B: Effets du DZP (0-1 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, sur le nombre d'entrées effectuées dans les bras ouverts et fermés (haut) et sur le nombre de redressements effectués (bas), chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

* Lots traités avec le DZP : 0.25 mg/kg (N = 7) ;
0.5 mg/kg (N = 7) ;
1 mg/kg (N = 7), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Aucun redressement ni toilettage n'a été noté dans les bras ouverts. D'autre part, des défécations ont été relevées uniquement dans les bras ouverts. La répartition spatiale de ces comportements suggère que les bras ouverts produisent, chez le rat, un niveau d'anxiété plus important que les bras fermés.

Le test de Kruskal-Wallis met en évidence une hétérogénéité pour les paramètres suivants (DDL = 3, N = 28) :

- TPS CENTRE : H = 6.72 ; N.S.
- TPS FER : H = 1.33 ; N.S.
- TPS OUV : H = 3.05 ; N.S.
- %TPS CENTRE : H = 6.72 ; N.S.
- %TPS FER : H = 1.33 ; N.S.
- %TPS OUV : H = 3.05 ; N.S.
- NB ENT FER : H = 4.13 ; N.S.
- NB ENT OUV : H = 3.19 ; N.S.
- NB TOT ENT : H = 0.99 ; N.S.
- %NB ENT FER : H = 9.52 ; p = .0232
- %NB ENT OUV : H = 9.52 ; p = .0232
- RED FER : H = 14.37 ; p = .0024
- TOTRED : H = 14.37 ; p = .0024
- TOIL FER : H = 0.44 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 0.44 ; N.S.
- DEF OUV : H = 6.75 ; N.S.
- TOTDEF : H = 6.75 ; N.S.
- MIC FER : H = 1.65 ; N.S.
- MIC OUV : H = 3.12 ; N.S.
- TOTMIC : H = 1.58 ; N.S.
- LAT SORTIE : H = 7.26 ; N.S.
- LAT ENT OUV1 : H = 5.01 ; N.S.
- TPS OUV1 : H = 3.52 ; N.S.
- LAT EXTR OUV1 : H = 0.75 ; N.S.

Par rapport au lot contrôle, les rats traités avec le DZP effectuent proportionnellement plus d'entrées dans les bras ouverts et moins dans les bras fermés et cette augmentation de l'exploration des bras ouverts s'accentue avec l'augmentation de la dose de DZP (Tableau 38, Figure 61). Le nombre de redressements effectués diminue significativement par rapport au lot contrôle et d'une manière dose-dépendante. Ces modifications vont dans le sens d'un effet de type anxiolytique pour les trois doses testées. De plus, le temps passé dans les bras ouverts tend à augmenter sous l'effet du DZP, mais sans atteindre le niveau de significativité. Le nombre total d'entrées effectuées, reflétant l'activité locomotrice, n'est pas modifié d'une manière significative par le DZP. Toutefois, le temps passé dans les bras fermés n'est pas modifié par le DZP. En fait, sous l'influence du DZP, les rats semblent passer moins de temps au centre du dispositif et consacrer plus de temps à explorer les bras

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.5 mg/kg		DZP 1 mg/kg		DZP 1.5 mg/kg		DZP 2 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
TPS CENTRE	113,0	12,1	89,0	12,6	41,0 **	11,3	51,9 **	10,2	47,8 **	13,7
TPS FER	181,0	12,1	201,5	13,2	247,0 **	13,1	240,7 **	9,5	245,7 **	14,8
TPS OUV	6,0	3,0	9,5	4,6	12,0	4,1	7,4	4,6	6,6	6,1
%TPS CENTRE	37,7	4,0	29,7	4,2	13,7 **	3,8	17,3 **	3,4	15,9 **	4,6
%TPS FER	60,3	4,0	67,2	4,4	82,3 **	4,4	80,2 **	3,2	81,9 **	4,9
% TPS OUV	2,0	1,0	3,2	1,5	4,0	1,4	2,5	1,5	2,2	2,0
NB ENT FER	9,6	0,8	7,0	1,0	4,1 **	1,0	3,8 ***	0,8	4,2 **	1,2
NB ENT OUV	0,4	0,2	0,8	0,3	1,0	0,3	0,6	0,3	0,4	0,2
NB TOT ENT	10,0	0,7	7,8	1,2	5,1 **	1,2	4,4 ***	0,8	4,7 **	1,3
%NB ENT FER	95,5	1,8	91,6	2,7	81,6	4,4	82,5	7,9	88,9	7,5
%NB ENT OUV	4,5	1,8	8,4	2,7	18,4	4,4	17,5	7,9	11,1	7,5
TOTRED	10,9	0,7	6,9 **	1,0	3,6 ***	1,0	5,6 *	1,9	2,8 ***	1,1
TOTTOIL	0,6	0,2	0,7	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2
DEF FER	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,4	0,1	0,1
DEF OUV	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
TOTDEF	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2	0,2	0,6	0,4	0,1	0,1
MIC FER	1,3	0,4	1,1	0,2	1,1	0,2	1,0	0,3	1,1	0,3
MIC OUV	0,2	0,1	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
TOTMIC	1,6	0,4	1,1	0,2	1,4	0,3	1,1	0,3	1,2	0,3
LAT SORTIE	15,4	1,7	21,1	5,2	44,2	28,5	60,8	27,8	72,4	32,1
LAT ENT OUV1	253,3	20,0	199,2	37,6	124,9	39,3	191,2	44,7	226,4	40,8
TPS OUV1	6,0	3,0	6,5	2,1	7,9	2,7	5,3	3,1	4,4	4,0
LAT EXTR OUV1	290,8	9,2	300,0	0,0	300,0	0,0	300,0	0,0	300,0	0,0

Tableau 39: Expérience n°9B: Effets du DZP (0-2 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5%, dans le labyrinthe en croix surélevé, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

du labyrinthe que les rats du lot contrôle. Il semble donc que, dans l'ensemble, le DZP produise des effets de type anxiolytique dans cette expérience.

C. Expérience n°9B : Effet du DZP (0.5-2 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5%

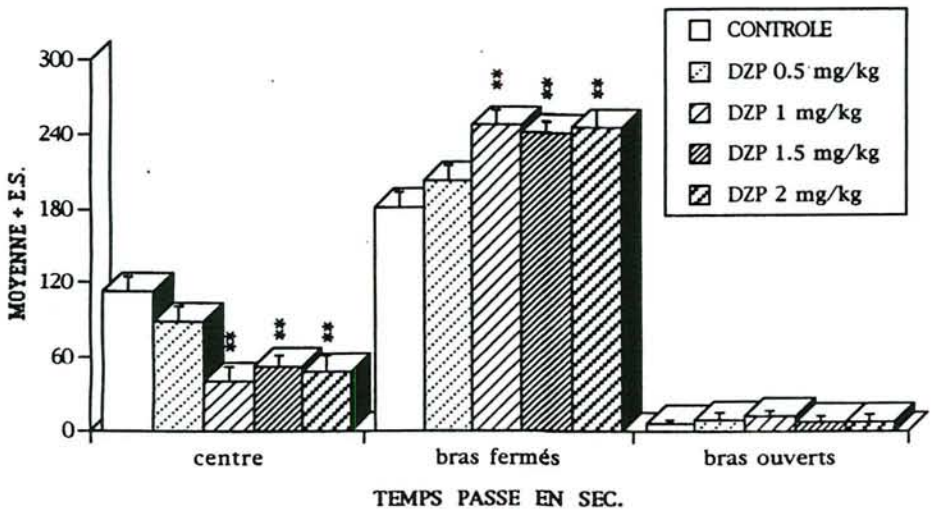
1. Matériel et méthodes

- Animaux : 51 rats mâles Wistar de 250-300 g (IFFA-CREDO).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le passage dans l'enceinte inconnue et 35 mn avant le passage dans le labyrinthe :
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 15%, Tween80 5% (N = 10) ;
  * Lots traités avec le DZP : 0.5 mg/kg (N = 10) ;
    1 mg/kg (N = 11) ;
    1.5 mg/kg (N = 10) ;
    2 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5%.

2. Résultats

Aucun redressement ni toilettage n'a été relevé dans les bras ouverts du dispositif, les résultats concernant ces deux paramètres n'ont donc pas été séparés pour les deux types de bras. L'analyse des données par le test de Kruskal-Wallis met en évidence une hétérogénéité pour les paramètres suivants (DDL = 4, N = 51) :

- TPS CENTRE : H = 17.49 ; p = .0016
- TPS FER : H = 15.51 ; p = .0038
- TPS OUV : H = 4.21 ; N.S.
- %TPS CENTRE : H = 17.49 ; p = .0016
- %TPS FER : H = 15.51 ; p = .0038
- %TPS OUV : H = 4.21 ; N.S.
- NB ENT FER : H = 16.74 ; p = .0022
- NB ENT OUV : H = 3.71 ; N.S.
- NB TOT ENT : H = 15.22 ; p = .0043
- %NB ENT FER : H = 4.63 ; N.S.
- %NB ENT OUV : H = 4.63 ; N.S.
- RED FER : H = 19.12 ; p = .0007
- TOTRED : H = 19.12 ; p = .0007
- TOIL FER : H = 1.91 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 1.91 ; N.S.
- DEF FER : H = 0.78 ; N.S.
- DEF OUV : H = 3.80 ; N.S.
- TOTDEF : H = 1.90 ; N.S.
- MIC FER : H = 0.83 ; N.S.
- MIC OUV : H = 4.20 ; N.S.
- TOTMIC : H = 1.41 ; N.S.
- LAT SORTIE : H = 9.09 ; N.S.
- LAT ENT OUV1 : H = 4.24 ; N.S.
- TPS OUV1 : H = 3.53 ; N.S.
- LAT EXTR OUV1 : H = 4.33 ; N.S.



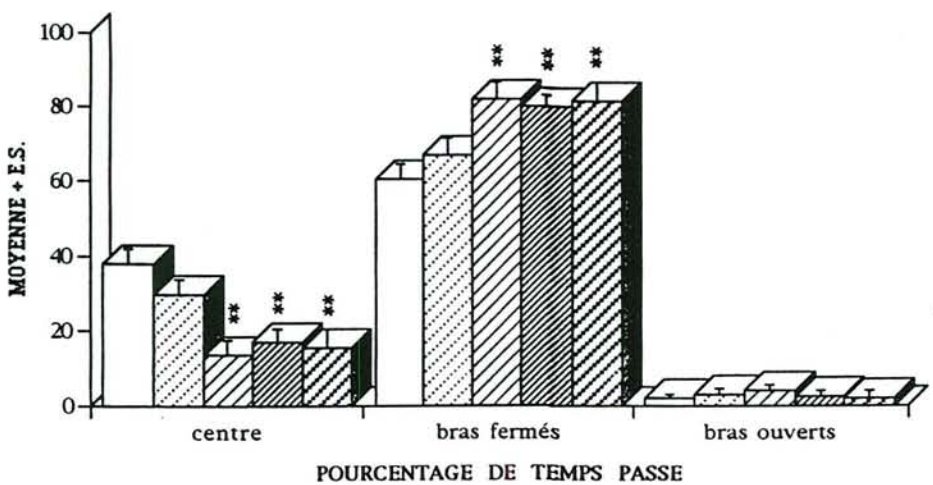
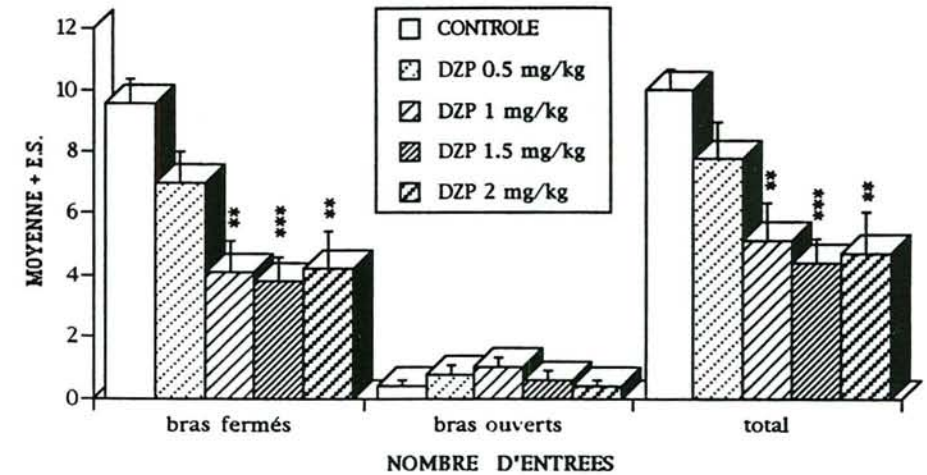


Figure 62: Expérience n°9B: Effets du DZP (0-2 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5%, sur le temps passé dans les différentes parties du labyrinthe en croix surélevé en sec. (haut) et en pourcentage (bas), chez le rat Wistar. **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).



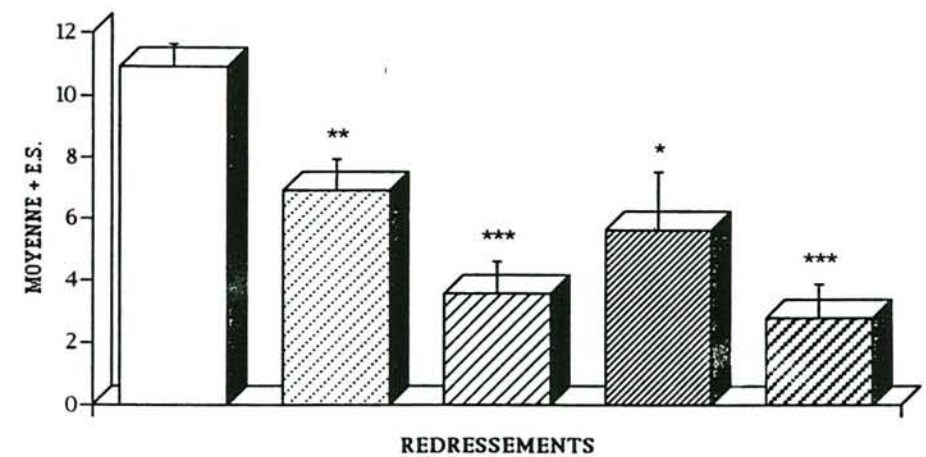


Figure 63: Expérience n°9B: Effets du DZP (0-2 mg/kg, i.p. 35 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 15%, Tween80 5%, sur le nombre d'entrées effectuées dans les bras (haut) et sur le nombre de redressements effectués (bas), chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

Cette expérience ressemble à la précédente, mis à part l'origine différente des animaux qui proviennent cette fois-ci d'un élevage industriel, et le véhicule qui a été dilué deux fois par rapport à l'expérience n°8B. En effet, dans l'expérience précédente, on pouvait penser que le manque de netteté des résultats obtenus avec le DZP était lié à une interférence avec le véhicule. L'expérience n°9B nous montre que tel n'était pas le cas : le DZP provoque une augmentation du temps passé dans les bras fermés (Figure 62), une diminution du nombre d'entrées dans les bras fermés ainsi que dans l'ensemble des bras (Figure 63), ce qui correspond à une activité sédative. Les redressements sont également inhibés par le DZP (Figure 63), mais pas d'une manière dose-dépendante. En résumé, les rats des lots traités avec le DZP passent plus de temps dans les bras fermés que les rats du lot contrôle et leur activité locomotrice est fortement réduite (Tableau 39).

Aucun effet de type anxiolytique n'est donc apparu dans cette expérience. Le profil comportemental obtenu coorespond à une activité sédative aux trois plus fortes doses. Les résultats obtenus dans l'expérience précédente montrent que cette activité sédative ne peut être attribuée au véhicule seul. Par conséquent, l'origine des animaux est à prendre en compte et, dans ce genre d'expériences, les rats devraient être soit élevés au laboratoire comme dans l'expérience n°8B, soit habitués aux conditions du laboratoire pendant une période plus longue.

D. Discussion

L'ensemble des expériences réalisées avec le DZP dans le labyrinthe en croix surélevé a permis de montrer d'une part, qu'une expérience préalable dans le dispositif sans traitement pharmacologique, induisait une tolérance aux effets anxiolytiques du DZP (Expérience n°7B), et d'autre part, qu'un effet anxiolytique pouvait être observé avec le DZP, mais avec des rats suffisamment habitués aux conditions du laboratoire (Expériences n°8B et 9B). Cet effet anxiolytique se manifeste par une augmentation de l'exploration des bras ouverts sans diminution du nombre total d'entrées effectuées dans les bras.

Cette procédure s'avère très intéressante car grâce à deux paramètres, elle permet de différencier l'activité sédative d'un traitement (nombre total d'entrées dans les bras) de ses effets sur le niveau d'anxiété des animaux (temps passé dans les deux types de bras, en sec. et en pourcentage).

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 1 mg/kg		DZP 2 mg/kg		DZP 3 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,0	0,5	2,3	0,7	2,3	0,6	1,8	0,5
ASC2	3,9	0,5	4,4	1,2	3,1	0,7	3,6	0,6
ASC3	4,0	0,8	4,3	1,2	3,6	1,0	3,9	0,8
TOTASC	10,9	1,2	10,9	2,9	9,0	1,5	9,3	1,0
DESC1	0,6	0,3	0,8	0,6	1,1	0,4	0,6	0,6
DESC2	3,0	0,7	4,1	1,3	1,4	0,6	2,4	0,6
DESC3	4,6	0,8	4,3	1,2	4,0	0,7	3,5	0,8
TOTDESC	8,3	1,1	9,1	2,6	6,5	1,1	6,5	1,6
MARCHES TOT	19,1	2,2	20,0	5,5	15,5	2,6	15,8	2,4
R+Rp1	7,0	0,7	5,0	0,7	5,1	0,9	4,0	0,7
R+Rp2	6,0	0,6	5,4	0,7	4,8	0,3	4,0	0,9
R+Rp3	5,5	2,1	4,9	0,4	3,6	0,5	5,0	1,3
TOTRR	18,5	3,3	15,3	1,0	13,5 **	1,0	13,0 *	2,2
DEF1	1,4	1,8	0,0 *	0,0	0,3	0,3	0,0 *	0,0
DEF2	1,5	1,9	0,6	0,4	0,0	0,0	0,1	0,1
DEF3	1,1	1,2	1,8 a	0,6	0,0 *	0,0	0,0 *	0,0
TOTDEF	4,0	3,6	2,4 a	0,9	0,3 *	0,3	0,1 *	0,1
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,3	0,1	0,1
TOIL3	0,5	0,8	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
TOTTOIL	0,5	0,8	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2
LAT M1	36,8	7,8	44,6	5,7	39,9	6,8	47,4	7,4
LAT M5	124,1	58,3	123,8	20,1	142,3	15,5	126,0	18,9

Tableau 40: Expérience n°10B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport à 2 et 3 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 8 par lot.

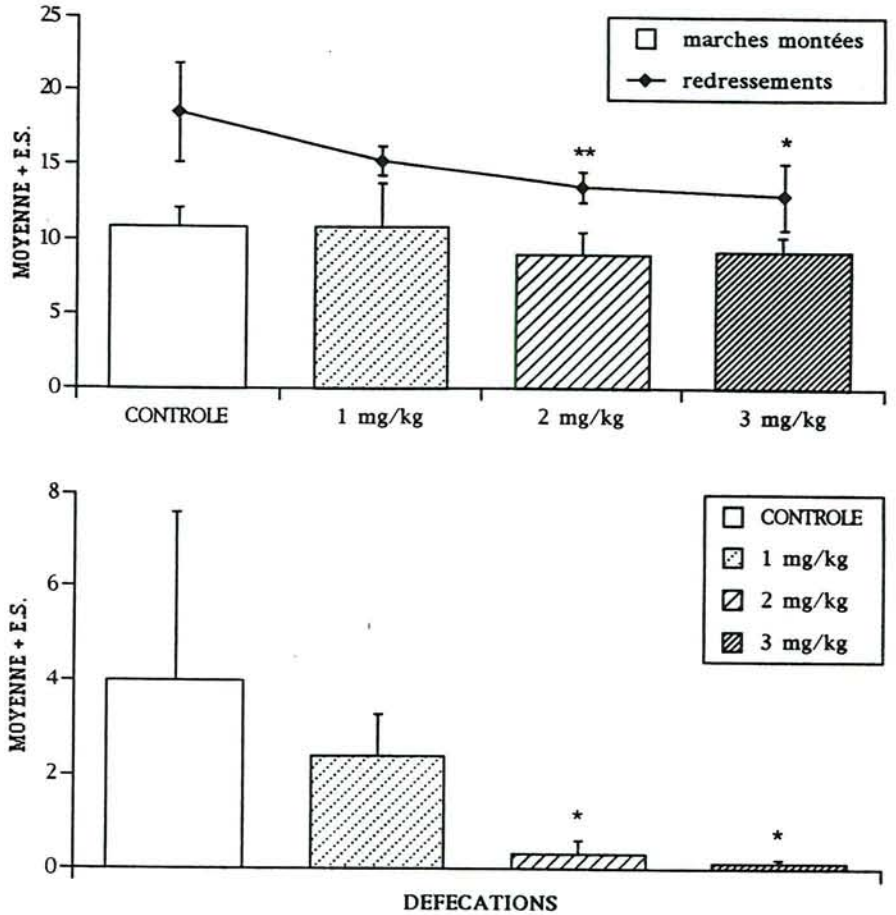


Figure 64: Expérience n°10B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol, chez le rat Wistar, sur le nombre total de marches montées, de redressements effectués (haut) et de défécations effectuées (bas). *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

IV. TEST DE L'ESCALIER

A. Expérience n°10B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans l'éthanol chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats mâles Wistar de 330-430 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Ethanol à 10% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 8) ;
    3 mg/kg (N = 8), en solution dans l'éthanol à 10%.

2. Résultats

L'analyse des résultats par le test de Kruskal-Wallis montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 32) :

- ASC1 : H = 2.40 ; N.S.
- ASC2 : H = 1.06 ; N.S.
- ASC3 : H = 0.14 ; N.S.
- TOTASC : H = 1.28 ; N.S.
- DESC1 : H = 5.33 ; N.S.
- DESC2 : H = 4.27 ; N.S.
- DESC3 : H = 0.90 ; N.S.
- TOTDESC : H = 1.64 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 1.57 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 7.28 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 3.36 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 4.15 ; N.S.
- TOTRR : H = 8.17 ; p = .043
- DEF1 : H = 10.00 ; p = .019
- DEF2 : H = 6.83 ; N.S.
- DEF3 : H = 13.67 ; p = .003
- TOTDEF : H = 10.06 ; p = .018
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 1.08 ; N.S.
- TOIL3 : H = 2.21 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 0.47 ; N.S.
- LAT M1 : H = 2.29 ; N.S.
- LAT M5 : H = 0.34 ; N.S.

Des différences statistiquement significatives apparaissent uniquement pour les redressements et les défécations (Tableau 40). Le nombre de marches montées ou descendues n'est pas significativement modifié par le DZP aux doses utilisées. Par contre, le DZP provoque une diminution dose-dépendante des redressements et des défécations, statistiquement significative à partir de 2 mg/kg (Figure 64), alors que l'activité exploratrice n'est pas significativement modifiée du

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 1 mg/kg		DZP 2 mg/kg		DZP 3 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,4	1,1	4,5 ab	0,8	0,3 *	0,2	1,8	1,2
ASC2	8,0	1,0	2,4 **a	0,7	0,5 ***	0,4	2,5 *	1,9
ASC3	6,6	1,9	1,5 *a	0,6	0,0 **	0,0	1,1 *	0,9
TOTASC	18,0	3,4	8,4 **ab	1,1	0,8 ***	0,4	5,4 *	3,9
DESC1	2,6	1,0	2,6 a	0,7	0,0 **	0,0	1,6	1,1
DESC2	7,4	1,1	2,5 **	0,9	0,8 ***	0,4	1,8 **	1,6
DESC3	7,3	1,8	1,6 **a	0,8	0,0 ***	0,0	0,5 ***	0,5
TOTDESC	17,3	3,5	6,8 **ab	1,0	0,8 ***	0,4	3,9 **	3,1
MARCHES TOT	35,3	6,9	15,1 **ab	2,1	1,5 ***	0,8	9,3 **	7,0
R+Rp1	4,8	0,7	2,8 *ab	0,4	1,3 **	0,3	1,9 *	1,0
R+Rp2	6,1	1,0	1,3 **	0,5	1,0 ***	0,3	1,5 **	1,4
R+Rp3	7,4	1,2	1,0 ***	0,5	0,4 ***	0,4	0,9 **	0,7
TOTRR	18,3	2,5	5,0 ***b	0,9	2,6 ***	0,6	4,3 **	3,1
DEF1	0,5	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,1	0,1
DEF2	1,3	0,6	0,8	0,5	0,8	0,5	0,6	0,5
DEF3	1,0	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4	0,1	0,1
TOTDEF	2,8	0,9	1,5	0,8	1,5	0,8	0,9	0,6
TOIL1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
TOIL3	0,5	0,2	0,0 *	0,0	0,0 *	0,0	0,1	0,1
TOTTOIL	0,8	0,2	0,1 *	0,1	0,0 **	0,0	0,3 *	0,3
LAT M1	34,5	8,2	24,8 ab	5,7	133,3 **	22,9	132,0	26,8
LAT M5	68,6	9,8	96,4 a	21,6	180,0 ***	0,0	142,9	24,3

Tableau 41: Expérience n°11B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport à 2 mg/kg; b: $p < .05$ par rapport à 3 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 8 par lot.

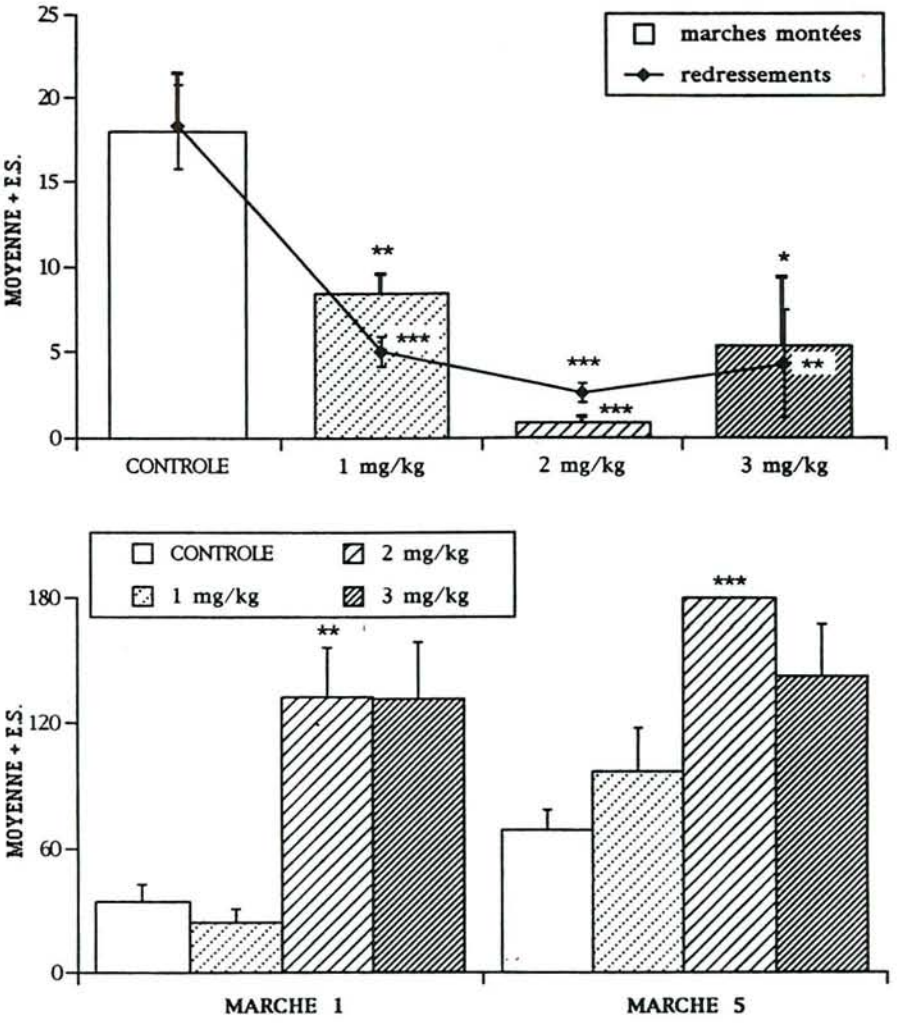


Figure 65: Expérience n°11B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI, chez le rat Wistar, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur la latence de montée de la première et de la dernière marche (bas). *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

point de vue statistique (Tableau 40). Ce profil va dans le sens des observations de Thiébot *et al.* (1973) et correspond à un effet de type anxiolytique.

Cette expérience montre que le DZP en solution dans l'éthanol, a un effet de type anxiolytique, ne s'accompagnant pas d'effets secondaires, à partir de 2 mg/kg de poids corporel.

B. Expérience n°11B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

Animaux : 32 rats mâles Wistar de 250-350 g (IFFA-CREDO).

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : DMI à 25% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 8) ;
    3 mg/kg (N = 8), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

Le test de Kruskal-Wallis, sur les 4 lots, montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 32) :

- ASC1 : H = 12.50 ; p = .0058
- ASC2 : H = 17.69 ; p = .0005
- ASC3 : H = 15.66 ; p = .0013
- TOTASC : H = 19.56 ; p = .0002
- DESC1 : H = 11.87 ; p = .0079
- DESC2 : H = 16.42 ; p = .0009
- DESC3 : H = 21.78 ; p = .0001
- TOTDESC : H = 20.70 ; p = .0001
- MARCHES TOT : H = 20.16 ; p = .0002
- R+Rp1 : H = 15.50 ; p = .0014
- R+Rp2 : H = 15.91 ; p = .0012
- R+Rp3 : H = 19.82 ; p = .0002
- TOTRR : H = 18.40 ; p = .0004
- DEF1 : H = 1.81 ; N.S.
- DEF2 : H = 1.37 ; N.S.
- DEF3 : H = 3.81 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.37 ; N.S.
- TOIL1 : H = 3.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 3.92 ; N.S.
- TOIL3 : H = 9.87 ; p = .02
- TOTTOIL : H = 12.93 ; p = .0048
- LAT M1 : H = 13.87 ; p = .0031
- LAT M5 : H = 14.08 ; p = .0028

Lorsque le DZP est dissous dans une solution de DMI à 25%, le profil comportemental des rats dans l'escalier est très différent de celui obtenu avec une dilution dans l'éthanol (Expérience n°10B). En effet, dans le cas présent, nous

observons une diminution de tous les paramètres observés, sauf des latences de montée des marches qui augmentent. A l'exception des défécations, toutes ces modifications sont statistiquement significatives (Tableau 41). Sous l'action du DZP, le nombre de redressements effectués et de marches montées diminuent d'une manière parallèle (Figure 65). On observe donc une nette diminution de l'activité exploratoire et la diminution du nombre de redressements ne peut pas être assimilée, dans cette expérience, à un effet de type anxiolytique du DZP.

En observant le comportement des animaux dans le dispositif, nous avons pu constater une perte de l'équilibre et une démarche titubante dans les lots traités avec le DZP. Les animaux montrent des difficultés pour monter les marches et pour se redresser sur les pattes postérieures. La plupart des tentatives de redressement ou de toilettage échouent en raison de cette perte d'équilibre.

Par contre, les rats du lot contrôle ne montrent aucune atteinte observable de l'équilibre. Cet effet n'est donc pas dû au solvant seul, ni au DZP seul (comme le montre l'expérience n°10B), mais à l'association des deux substances.

Ces conditions expérimentales ne permettent pas de montrer les effets anxiolytiques du DZP, ceux-ci étant probablement masqués par les effets secondaires liés au véhicule d'injection. En conclusion, l'emploi du DMI comme véhicule d'injection ne permet pas d'obtenir les conditions favorables à la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec le DZP, dans le test de l'escalier chez le rat Wistar.

Il faut noter que l'association DZP/DMI, dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, n'avait pas empêché la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec le DZP. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que la perte de l'équilibre observée après les injections n'affecte pas les paramètres pris en compte dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, contrairement aux paramètres mesurés dans le test de l'escalier. En d'autres termes, l'effet titubant n'empêche pas le rat de boire le lait sucré, mais altère considérablement sa capacité de se déplacer dans l'escalier.

C. Expérience n°12B : Effet du DZP (1-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI chez le rat Long-Evans

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 24 rats mâles Long-Evans de 350-450 g (JANVIER).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : DMI à 25% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 1 mg/kg (N = 8) ;
    2 mg/kg (N = 8) ;
    3 mg/kg (N = 8), en solution dans le DMI à 25%.

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 1 mg/kg		DZP 2 mg/kg		DZP 3 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	7,3	0,7	5,5	1,9	4,0	1,3	4,3	1,6
ASC2	6,5	2,1	6,0	1,8	4,7	1,1	4,7	1,8
ASC3	3,8	1,4	3,3	1,5	2,3	1,1	2,7	1,8
TOTASC	17,7	3,5	14,8	3,8	11,0	2,5	11,7	4,9
DESC1	4,0	1,3	3,3	1,4	2,7	1,4	3,0	1,4
DESC2	4,8	1,2	5,5	1,9	4,5	1,2	4,7	2,0
DESC3	6,2	2,3	3,0	1,1	1,7	1,1	2,7	1,5
TOTDESC	15,0	4,3	11,8	3,6	8,8	2,6	10,3	4,7
MARCHES TOT	32,7	7,8	26,7	7,3	19,8	5,1	22,0	9,6
R+Rp1	7,7	0,8	4,0 *	0,7	3,8 *	0,9	2,3 **	0,7
R+Rp2	7,8	1,2	4,5	1,3	2,5 **	0,4	1,8 **	0,4
R+Rp3	5,7	0,5	3,0	1,2	1,7	0,4	2,3	1,6
TOTRR	21,2	1,4	11,5 *	2,7	8,0 **	1,3	6,5 **	1,9
DEF1	2,0	0,5	0,0 **	0,0	0,0 **	0,0	0,7	0,4
DEF2	1,0	0,4	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,2
DEF3	1,0	0,4	0,5	0,3	0,2	0,2	0,8	0,7
TOTDEF	4,0	0,5	0,8 *	0,7	0,7 **	0,5	1,7 *	0,8
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
TOTTOIL	0,5	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
LAT M1	8,5	4,5	48,7 *	27,5	39,5 **	7,8	55,5 *	26,5
LAT M5	16,3	5,3	63,5 *	25,0	105,5 *	25,8	110,2 **	31,3

Tableau 42: Expérience n°12B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI, dans le test de l'escalier, chez le rat Long-Evans. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney). N = 6 par lot.

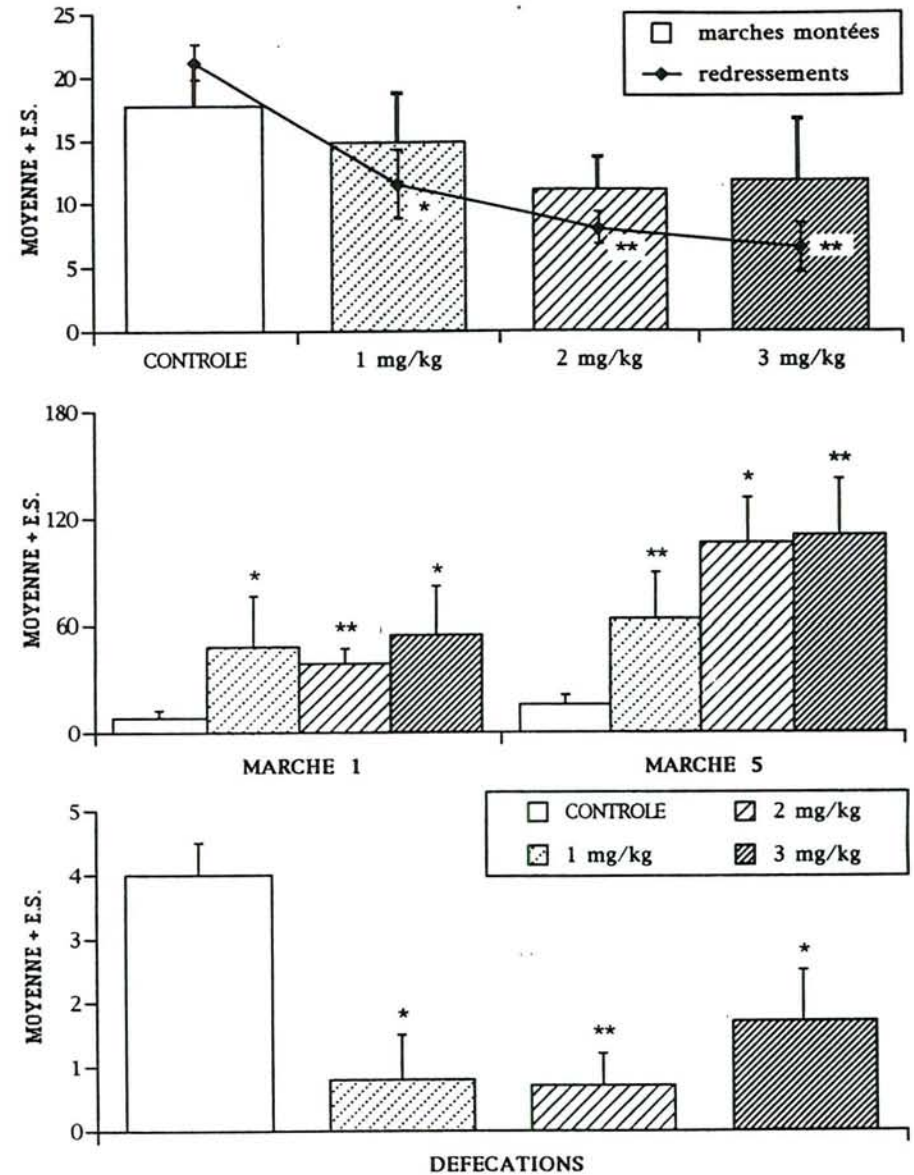


Figure 66: Expérience n°12B: Effets du DZP (0-3 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI, chez le rat Long-Evans, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut), sur la latence de montée de la première et de la dernière marche (milieu) et sur le nombre de défécations effectuées (bas). *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

2. Résultats

L'analyse des résultats, présentés dans le Tableau 42, par le test de Kruskal-Wallis montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 24) :

- ASC1 : H = 3.65 ; N.S.
- ASC2 : H = 0.98 ; N.S.
- ASC3 : H = 0.79 ; N.S.
- TOTASC : H = 2.47 ; N.S.
- DESC1 : H = 0.72 ; N.S.
- DESC2 : H = 0.31 ; N.S.
- DESC3 : H = 3.01 ; N.S.
- TOTDESC : H = 1.49 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 2.08 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 12.67 ; p = .0054
- R+Rp2 : H = 11.03 ; p = .0116
- R+Rp3 : H = 7.78 ; p = .0508
- TOTRR : H = 13.49 ; p = .0037
- DEF1 : H = 13.15 ; p = .0043
- DEF2 : H = 4.18 ; N.S.
- DEF3 : H = 2.96 ; N.S.
- TOTDEF : H = 10.55 ; p = .0145
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL3 : H = 6.54 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 6.54 ; N.S.
- LAT M1 : H = 8.97 ; p = .0297
- LAT M5 : H = 11.09 ; p = .0113

Dans cette expérience, nous avons appliqué exactement les mêmes conditions que dans l'expérience n°11B. Seule la souche de rat employée était différente. Or, avec le rat Long-Evans, nous n'obtenons pas exactement le même profil comportemental qu'avec la souche Wistar. En effet, nous observons une légère diminution de l'activité exploratoire (marches montées ou descendues) mais non significative du point de vue statistique (Figure 66). Par contre, les redressements et les défécations sont nettement moins fréquents dans les lots traités avec le DZP et ces diminutions sont statistiquement significatives (Tableau 42). Il semble donc que le DZP présente, dans ces conditions, un profil plus proche du profil de type anxiolytique que dans l'expérience précédente avec le rat Wistar. En effet, les deux paramètres, redressements et marches montées, n'évoluent pas d'une manière rigoureusement parallèle (Figure 66). Les redressements diminuent d'une façon plus marquée, statistiquement significative aux trois doses testées, alors que le nombre de marches montées reste pratiquement stable aux trois doses. Toutefois, le traitement provoque, comme chez le rat Wistar, une augmentation statistiquement significative des latences de montée des marches (Figure 66).

La perte d'équilibre liée au solvant d'injection est nettement moins marquée chez le rat Long-Evans. Cette souche de rats semble un peu moins sensible à l'effet du DMI que la souche Wistar. Le rat Long-Evans étant beaucoup plus actif que le rat Wistar, ceci explique peut-être la différence d'effet sur le nombre de marches montées.

En comparant les données des lots contrôles des expériences n°11B et 12B (c'est-à-dire rats Wistar et Long-Evans, respectivement), on constate que les nombres totaux de marches montées ou descendues sont comparables, de même pour les redressements, les défécations et les toilettages. Les seules différences notables se situent au niveau des latences de montée des marches qui sont nettement plus courtes chez le rat Long-Evans (environ quatre fois plus faibles) et ceci pour les deux latences mesurées. Lorsqu'on compare leurs activités locomotrices minute par minute, on constate que les rats Long-Evans sont plus actifs en début qu'en fin de test, alors que les rats Wistar sont plus actifs pendant les deux dernières minutes du test que pendant la première. Donc, le rat Long-Evans monte plus rapidement les marches de l'escalier et présente moins d'aversion pour la montée des marches que le rat Wistar, mais l'activité exploratrice totale et l'activité générale sont comparables pour les deux souches dans la situation du test.

Par contre, en ce qui concerne les lots traités avec 2 mg de DZP par kg, le rat Wistar ne monte pratiquement plus les marches (0.8 ± 0.4 en 3 mn), alors que le rat Long-Evans monte, en moyenne, 11 marches (± 2.5) en 3 mn. La souche Long-Evans semble donc moins sensible à l'effet déséquilibrant du solvant et, mise à part l'augmentation de la latence de montée des marches, le comportement des rats dans cette expérience pourrait être assimilable à un profil de type anxiolytique, puisque le nombre de marches montées ou descendues n'est pas significativement modifié du point de vue statistique alors que le nombre de redressements effectués diminue de manière statistiquement significative.

D. Expérience n°13B : Effet du DZP (0.5-1 mg/kg, i.v. 30 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats femelles Wistar de 200-270 g (élevage du laboratoire).

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 30 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 8) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 0.5 mg/kg (N = 8) ;
    1 mg/kg (N = 8), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		DZP 0.5 mg/kg		DZP 1 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	5,5	0,3	6,0	0,8	4,1	1,1	4,0	1,2
ASC2	8,8	0,9	6,1	1,0	3,1 °**	1,2	2,9 °°	1,0
ASC3	7,1	0,9	6,9	1,3	0,4 °°***a	0,2	3,0 °*	1,4
TOTASC	21,4	1,3	19,0	2,6	7,6 °°**	2,0	9,9 °	3,3
DESC1	3,6	0,6	2,6	0,6	3,3	0,8	2,8	0,9
DESC2	7,5	0,7	6,4	1,4	2,9 °°	1,0	3,8	1,4
DESC3	7,9	0,9	7,0	1,4	0,6 °°**	0,4	2,5 °**	1,1
TOTDESC	19,0	1,3	16,0	2,9	6,8 °°**	1,8	9,0 °	3,0
MARCHES TOT	40,4	2,5	35,0	5,5	14,4 °°**	3,7	18,9 °	6,3
R+Rp1	7,1	0,7	8,4	0,6	3,4 °°**	0,8	4,1 °**	0,9
R+Rp2	11,5	1,2	10,3	1,4	3,1 °°**	1,0	4,3 °	1,7
R+Rp3	14,8	0,8	12,0	0,9	2,1 °°**	1,1	2,3 °°**	1,2
TOTRR	33,4	2,0	30,6	1,8	8,6 °°***a	2,2	10,6 °°**	3,5
DEF1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
TOTDEF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
TOIL1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1
TOTTOIL	0,5	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,1	0,1
LAT M1	10,1	1,9	19,3 °	2,4	35,0	20,8	46,6 °	20,0
LAT M5	56,1	8,3	62,3	7,9	97,0	25,6	128,1	25,6

Tableau 43: Expérience n°13B: Effets du DZP (0-1 mg/kg, i.v. 30 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport au lot témoin (test de Mann-Whitney). N = 8 par lot.

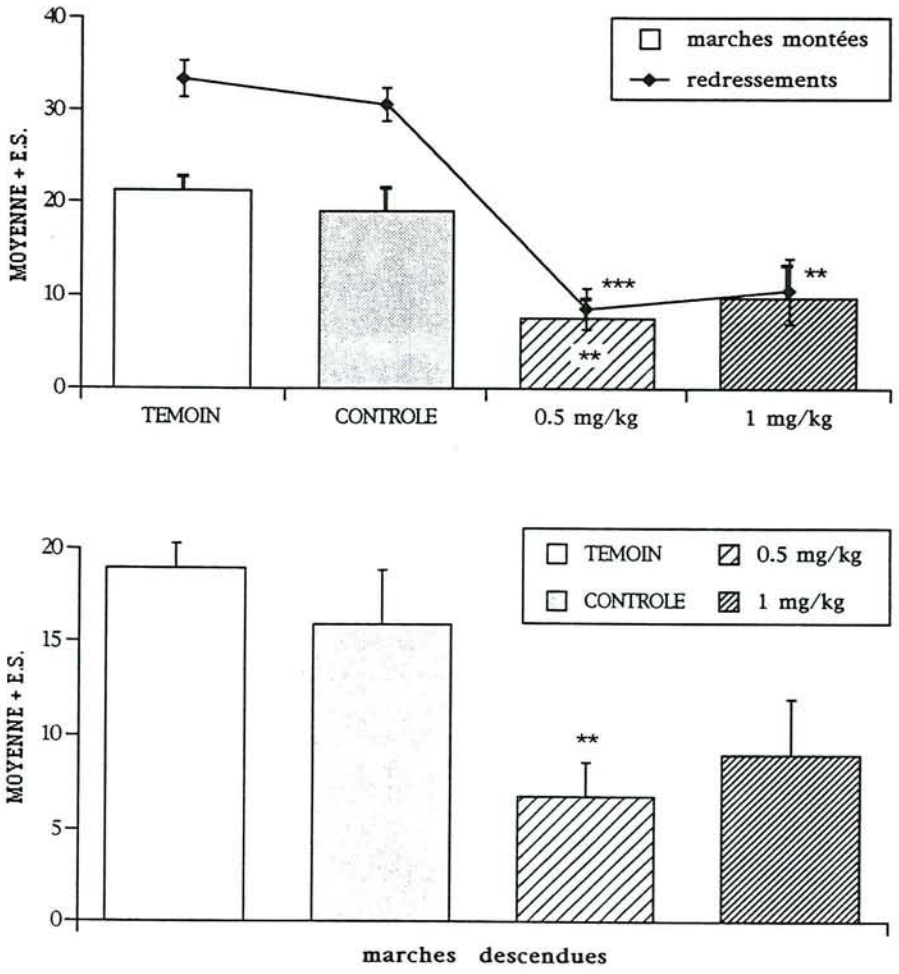


Figure 67: Expérience n°13B: Effets du DZP (0-1 mg/kg, i.v. 30 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez le rat Wistar, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur le nombre total de marches descendues (bas). **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

2. Résultats

L'analyse par le test de Kruskal-Wallis montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 32) :

- ASC1 : H = 4.24 ; N.S.
- ASC2 : H = 14.02 ; p = .0029
- ASC3 : H = 16.63 ; p = .0008
- TOTASC : H = 16.04 ; p = .0011
- DESC1 : H = 1.08 ; N.S.
- DESC2 : H = 9.55 ; p = .0228
- DESC3 : H = 18.30 ; p = .0004
- TOTDESC : H = 14.59 ; p = .0022
- MARCHES TOT : H = 15.31 ; p = .0016
- R+Rp1 : H = 17.19 ; p = .0006
- R+Rp2 : H = 16.13 ; p = .0011
- R+Rp3 : H = 23.34 ; p = .0001
- TOTRR : H = 22.57 ; p = .0001
- DEF1 : H = 0.00 ; N.S.
- DEF2 : H = 0.00 ; N.S.
- DEF3 : H = 3.00 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.00 ; N.S.
- TOIL1 : H = 2.07 ; N.S.
- TOIL2 : H = 3.92 ; N.S.
- TOIL3 : H = 2.39 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 2.20 ; N.S.
- LAT M1 : H = 8.50 ; p = .0367
- LAT M5 : H = 3.48 ; N.S.

Les lots témoin et contrôle ne diffèrent que par une augmentation de la latence de montée de la première marche dans le lot contrôle (Tableau 43). Le solvant d'injection ne modifie donc pratiquement pas le comportement des animaux dans cette expérience. En ce qui concerne les lots traités avec le DZP, on observe, par rapport aux lots témoin et contrôle, une diminution du nombre de marches montées et descendues, significative uniquement à la plus faible dose (Figure 67). Le nombre de redressements effectués diminue d'une manière statistiquement significative avec 0.5 et 1 mg de DZP par kg, mais là encore, la diminution est moins marquée à la plus faible dose testée (Figure 67). La latence de montée des marches 1 et 5 a tendance à augmenter avec le DZP, mais n'atteint pas le niveau de significativité statistique. Par conséquent, aucun effet de type anxiolytique ne peut être mis en évidence avec 0.5 et 1 mg de DZP par kg, lorsque l'injection est réalisée par voie i.v., 30 mn avant le test. Par contre, on observe un effet sédatif se manifestant par une diminution de l'activité locomotrice et exploratrice par rapport aux lots témoin et contrôle, qui pourrait être lié soit au DZP, soit au véhicule d'injection, soit à la combinaison des deux. La comparaison des lots témoin et contrôle montre qu'il ne s'agit pas d'un effet lié uniquement au véhicule, et les résultats des expériences précédentes suggèrent qu'il ne s'agit pas d'un effet lié uniquement au DZP. En effet, lorsque le DZP est administré en i.p. en solution dans l'éthanol (expérience n°10B), il montre un profil de type anxiolytique, sans effet sédatif avec des doses plus importantes (2 et 3 mg/kg). Par contre, lorsqu'il est administré soit en i.p. en solution dans le DMI (1-3

TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.1 mg/kg		DZP 0.2 mg/kg		DZP 0.4 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	1,9	0,6	2,5	0,5	3,0	0,8	2,0	0,4
ASC2	4,6	0,7	5,1	1,0	5,1	1,2	4,4	0,9
ASC3	6,3	0,9	6,6	0,8	7,9	1,3	6,5	0,8
TOTASC	12,8	1,8	14,3	2,0	16,0	2,9	12,9	1,2
DESC1	0,1	0,1	0,6	0,5	1,4	0,6	0,5	0,3
DESC2	4,3	0,9	4,9	1,0	4,9	1,1	3,3	0,6
DESC3	5,9	1,0	6,3	1,0	7,1	0,7	5,9	1,0
TOTDESC	10,3	1,6	11,8	1,9	13,4	1,8	9,6	1,3
MARCHES TOT	23,0	3,3	26,0	3,8	29,4	4,6	22,5	2,4
R+Rp1	5,5	0,6	5,8	0,7	6,6	0,7	4,9	0,5
R+Rp2	7,8	1,7	9,0	1,5	7,1	1,1	6,8	0,9
R+Rp3	10,3	1,4	11,3	0,8	10,8	1,7	8,0	1,0
TOTRR	23,5	3,0	26,0	1,9	24,5	2,9	19,6	1,6
DEF1	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
DEF2	0,4	0,4	0,0	0,0	0,9 a	0,4	0,0	0,0
DEF3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,3	0,0	0,0
TOTDEF	0,8	0,8	0,0	0,0	1,5	0,7	0,1	0,1
TOIL1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0
TOIL3	0,5	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,4	0,3
TOTTOIL	0,6	0,3	0,5	0,3	0,1	0,1	0,4	0,3
LAT M1	59,1	15,1	34,5	5,9	30,6	6,5	42,3	7,1
LAT M5	118,8	14,2	111,6	13,9	113,4	18,4	130,0	13,3

Tableau 44: Expérience n°14B: Effets du DZP (0-0.4 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. a: $p < .05$ par rapport à 0.1 et 0.4 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 8 par lot.

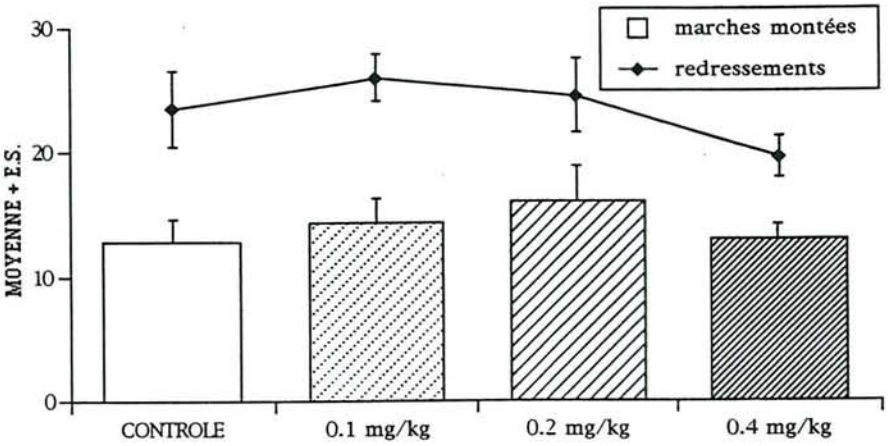


Figure 68: Expérience n°14B: Effets du DZP (0-0.4 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez le rat Wistar, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués.

mg/kg ; expérience n°11B), soit en i.v. en solution dans le mélange Transcutol / Tween80 (0.5-1 mg/kg ; expérience n°13B), il ne montre plus un profil de type anxiolytique, mais un effet sédatif. Il semble donc que la combinaison du DZP avec certains solvants empêche la mise en évidence d'une activité anxiolytique.

Etant donné que le solvant seul ne montre aucun effet dans le test de l'escalier lorsqu'il est administré 30 ou 60 mn avant le test (expériences n°4A et 5A), mais que les valeurs des différents paramètres observés sont plus proches de celles des témoins après 60 mn qu'après 30 mn, il apparaît que l'évaluation de l'effet du DZP et des SLC, qui sont supposés avoir des effets de longue durée, pourrait être plus profitable avec un délai de 60 mn entre le traitement et le test. De plus, les doses employées dans l'expérience n°13B étaient peut-être trop élevées pour pouvoir produire un effet anxiolytique dépourvu d'effets secondaires.

E. Expérience n°14B : Effet du DZP (0.1-0.4 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez le rat Wistar

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats femelles Wistar de 150-200 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le DZP : 0.1 mg/kg (N = 8) ;
    0.2 mg/kg (N = 8) ;
    0.4 mg/kg (N = 8), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Dans cette expérience, le délai entre traitement et test a été amené à 60 mn, au lieu de 30 mn. De plus, le DZP a été administré à des doses plus faibles que dans l'expérience précédente.

Les résultats de cette expérience sont reportés dans le Tableau 44. Le test de Kruskal-Wallis, effectué sur l'ensemble des données, montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 32) :

- ASC1 : H = 1.52 ; N.S.
- ASC2 : H = 0.87 ; N.S.
- ASC3 : H = 0.62 ; N.S.
- TOTASC : H = 0.73 ; N.S.
- DEF1 : H = 1.08 ; N.S.
- DEF2 : H = 9.30 ; p = .0256
- DEF3 : H = 6.76 ; N.S.
- TOTDEF : H = 6.95 ; N.S.

- DESC1 : H = 7.08 ; N.S.
- DESC2 : H = 1.72 ; N.S.
- DESC3 : H = 0.85 ; N.S.
- TOTDESC : H = 1.84 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 1.21 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 3.72 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 1.27 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 4.73 ; N.S.
- TOTRR : H = 4.35 ; N.S.
- TOIL1 : H = 3.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 2.21 ; N.S.
- TOIL3 : H = 4.04 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 2.75 ; N.S.
- LAT M1 : H = 4.90 ; N.S.
- LAT M5 : H = 0.75 ; N.S.

La seule différence statistiquement significative détectée se situe au niveau des défécations effectuées pendant la deuxième mn du test : les rats traités avec la dose intermédiaire (0.2 mg/kg) effectuent plus de défécations que les deux autres lots traités avec le DZP. Ni les redressements, ni la montée des marches ne sont affectés par le DZP aux doses testées (Figure 68). On n'observe donc aucun effet sur l'activité locomotrice et exploratrice, avec 0.1, 0.2 et 0.4 mg de DZP par kg de poids corporel. Il n'y a ni sédation ni effet de type anxiolyse.

La diminution générale de l'activité observée dans l'expérience précédente (Tableau 43) avec 0.5 et 1 mg de DZP administrés 30 mn avant le test, a donc disparu après 60 mn et les doses employées dans l'expérience présente étaient probablement trop faibles pour induire des modifications observables du comportement des animaux dans le test de l'escalier.

F. Expérience n°15B : Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 56 rats mâles Wistar de 130-180 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * 3 lots contrôles : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N1 = 7, N2 = 12, N3 = 10) ;
  * 3 lots traités avec le DZP : 0.8 mg/kg (N1 = 7, N2 = 10, N3 = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

EXPERIENCE	n° 1				n° 2				n° 3			
TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	2,0	1,0	2,1	0,9	3,0	0,5	3,4	0,5	2,3	0,6	3,6	0,7
ASC2	2,4	0,8	3,4	0,9	5,2	0,5	5,1	0,6	3,7	0,9	4,3	0,9
ASC3	3,3	0,6	2,1	0,9	5,1	0,7	4,3	0,9	2,9	0,7	5,2	1,1
TOTASC	7,7	1,7	7,7	2,0	13,3	1,2	12,8	1,5	8,9	0,9	13,1	2,0
DESC1	0,9	0,4	1,6	0,9	0,7	0,3	2,0 *	0,5	1,3	0,4	2,2	0,6
DESC2	2,1	0,8	2,0	0,9	3,8	0,5	4,7	0,7	1,5	0,6	3,6 *	0,8
DESC3	3,3	0,7	2,3	0,7	6,0	0,7	3,9	1,0	4,2	0,6	5,3	1,2
TOTDESC	6,3	1,5	5,9	1,3	10,5	1,0	10,6	1,7	7,0	1,1	11,1	2,1
MARCHES TOT	14,0	3,2	13,6	3,3	23,8	2,2	23,4	3,1	15,9	2,0	24,2	4,0
R+Rp1	5,6	0,9	4,4	1,2	6,6	0,6	6,2	0,9	5,6	0,6	5,2	0,7
R+Rp2	7,3	0,8	3,9	1,1	7,9	1,0	7,8	0,8	5,8	0,9	7,3	0,6
R+Rp3	9,4	1,1	3,1 **	1,2	9,7	1,1	7,5	1,2	8,3	1,6	6,4	1,3
TOTRR	22,3	2,3	11,4 *	2,6	24,2	2,0	21,5	2,0	19,7	2,5	18,9	2,0
DEF1	0,3	0,2	0,9	0,6	0,1	0,1	0,4 *	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0
DEF2	1,4	0,7	0,4	0,3	0,3	0,3	1,1 *	0,5	0,6	0,4	1,2	0,8
DEF3	1,4	0,4	0,3 *	0,2	0,5	0,4	0,6	0,3	0,8	0,6	0,2	0,1
TOTDEF	3,1	1,0	1,6	1,0	0,8	0,7	2,1	0,7	1,5	0,6	1,4	0,8
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
TOIL2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,5	0,3	0,0	0,0
TOIL3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,7	0,1	0,6	0,2	0,0	0,0	0,4	0,2
TOTTOIL	0,6	0,2	0,4	0,2	0,8	0,2	0,7	0,3	0,5	0,3	0,5	0,2
LAT M1	47,3	16,8	61,1	24,7	35,2	7,0	22,0	4,3	30,7	5,9	16,4	2,8
LAT M5	130,0	22,6	113,4	29,0	100,3	12,1	103,1	15,3	93,8	17,2	96,6	18,8

Tableau 45: Expérience n°15B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney). N = 7 à 12 par lot.

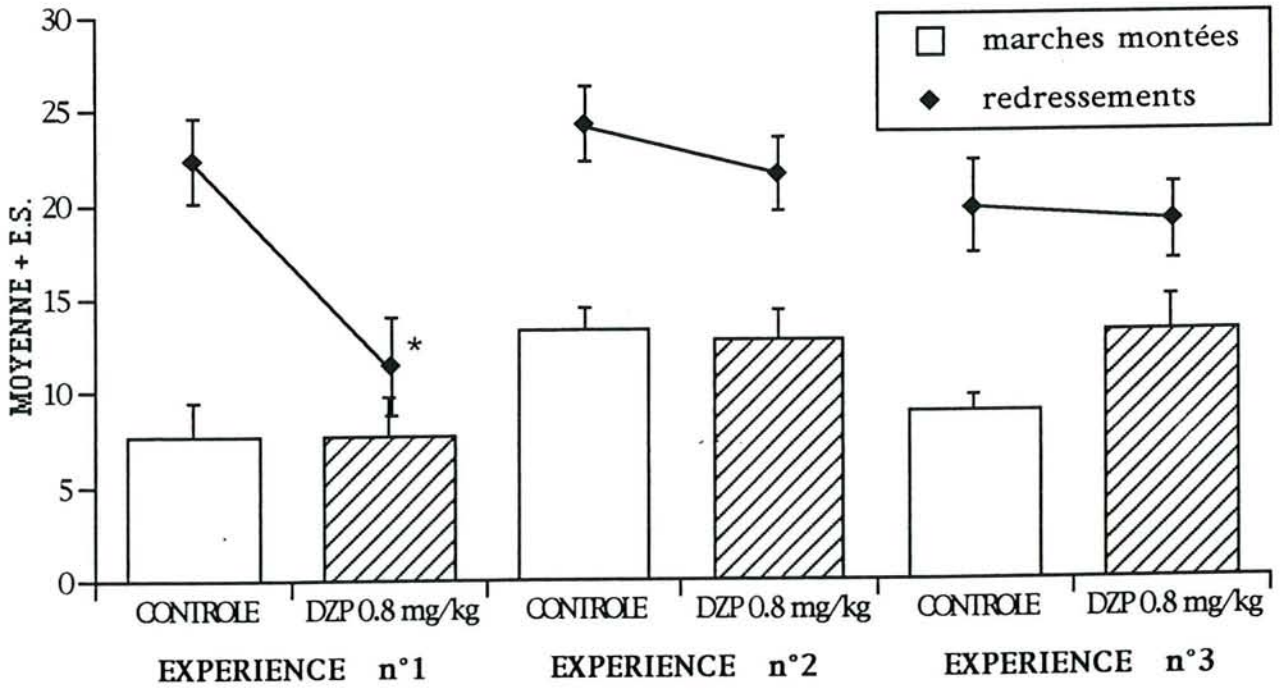


Figure 69: Expérience n°15B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10% sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

Trois expériences successives ont été réalisées avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg, comparé à un lot contrôle à chaque expérience, afin de tester la reproductibilité des effets du DZP dans le test de l'escalier.

2. Résultats

Les 2 lots de chaque expérience, contrôle et DZP, ont été comparés avec le test de Mann-Whitney, dont les résultats significatifs sont reportés dans le Tableau 45. Dans la première expérience, le DZP induit une diminution du nombre de redressements pendant la troisième mn du test et pendant la durée totale du test (Figure 69). De plus, le DZP diminue le nombre de défécations pendant la troisième mn du test (Tableau 45). Les autres paramètres, notamment le nombre de marches montées, ne sont pas modifiés par le DZP. Dans la deuxième expérience par contre, le DZP ne modifie significativement, ni le nombre de redressements effectués, ni le nombre de marches montées (Figure 69). Il augmente le nombre de marches descendues pendant la première mn du test et le nombre de défécations pendant la deuxième mn du test (Tableau 45). De même, dans la troisième expérience, ni le nombre de marches montées, ni le nombre de redressements effectués ne sont affectés par le DZP (Figure 69). Dans cette dernière expérience, la seule différence statistiquement significative par rapport au lot contrôle est le nombre de marches descendues pendant la deuxième mn du test : celui-ci est multiplié par 2 dans le lot traité avec le DZP, par rapport au lot contrôle (Tableau 45).

Même au sein des 3 lots contrôles, on observe des variations importantes. Le nombre total de marches montées et descendues, par exemple, varie entre 14.0 ± 3.2 (moyenne ± E.S.) dans la première expérience et 24.2 ± 2.0 dans la deuxième. Pourtant, les animaux ont la même origine dans les 3 expériences (élevage standardisé d'IFFA-CREDO) et, après leur arrivée au laboratoire, ils ont été habitués aux conditions d'élevage pendant une semaine.

Par conséquent, il semble que cette période d'habituation soit insuffisante pour permettre l'obtention de résultats comportementaux reproductibles, d'une expérience à l'autre. Dans les expériences suivantes, cette période d'habituation a été amenée à 2 semaines.

TRAITEMENT	TEMOIN				CONTROLE				DZP 0.8 mg/kg			
HANDLING	SANS		AVEC		SANS		AVEC		SANS		AVEC	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,3	0,5	1,6	0,5	3,8	0,5	2,2	0,6	3,6	0,7	2,4	0,7
ASC2	5,3	0,7	3,8	0,6	5,2	0,7	4,5	1,1	5,5	1,0	3,1	0,9
ASC3	4,8	0,6	5,2	0,8	5,9	0,7	6,1	1,1	4,2	1,0	4,2	0,9
TOTASC	13,3	1,4	10,7	1,4	14,8	1,4	12,8	2,5	13,3	2,2	9,8	1,9
DESC1	0,7	0,2	0,5	0,2	1,5	0,4	0,8	0,3	2,4 *	0,6	0,8 a	0,4
DESC2	5,2	0,6	3,1	0,6	5,8	0,8	4,2	1,0	4,2	0,7	3,0	0,6
DESC3	5,0	0,8	4,5	0,6	5,6	0,5	5,3	1,1	4,3	0,8	4,8	1,2
TOTDESC	10,8	1,3	8,1	1,1	12,8	1,3	10,3	2,2	10,8	1,9	8,6	1,9
MARCHES TOT	24,2	2,6	18,8	2,4	27,7	2,7	23,1	4,7	24,1	4,1	18,3	3,7
R+Rp1	7,1	1,1	6,1	0,7	8,3	0,6	6,3	0,8	6,2	0,6	5,0	0,8
R+Rp2	6,9	0,7	8,5	1,1	10,2 *	1,0	8,3	0,6	6,1 **	0,8	5,3 °*	0,9
R+Rp3	10,6	1,2	10,7	1,2	10,4	1,1	10,8	1,2	5,1 °**	1,1	6,9 *	1,2
TOTRR	24,6	2,6	25,3	2,7	28,8	2,1	25,5	1,9	17,3 °**	2,0	17,2 °*	2,2
DEF1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,6 *	0,3	0,2	0,2
DEF2	0,5	0,4	0,2	0,2	0,0	0,0	0,6	0,4	0,5	0,3	2,1 *	0,7
DEF3	0,9	0,4	0,3	0,2	0,4	0,3	0,6	0,4	0,4	0,2	1,0	0,5
TOTDEF	1,5	0,8	0,5	0,3	0,4	0,3	1,2	0,7	1,5	0,5	3,3 °*	0,9
TOIL1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1
TOIL3	0,6	0,2	0,5	0,2	0,7	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2
TOTTOIL	0,8	0,3	0,8	0,2	0,8	0,2	0,9	0,3	0,4	0,2	0,7	0,2
LAT M1	31,6	4,3	58,9	11,4	28,6	2,9	54,7	13,8	40,3	13,9	48,7	13,9
LAT M5	110,8	14,5	131,3	11,5	75,0	10,7	128,5	15,3	91,8	18,9	121,3	20,4

Tableau 46: Expérience n°16B: Influence du handling sur les effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin correspondant; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle correspondant; a: $p < .05$ par rapport au lot sans handling correspondant (test de Mann-Whitney). N = 9 à 13 par lot.

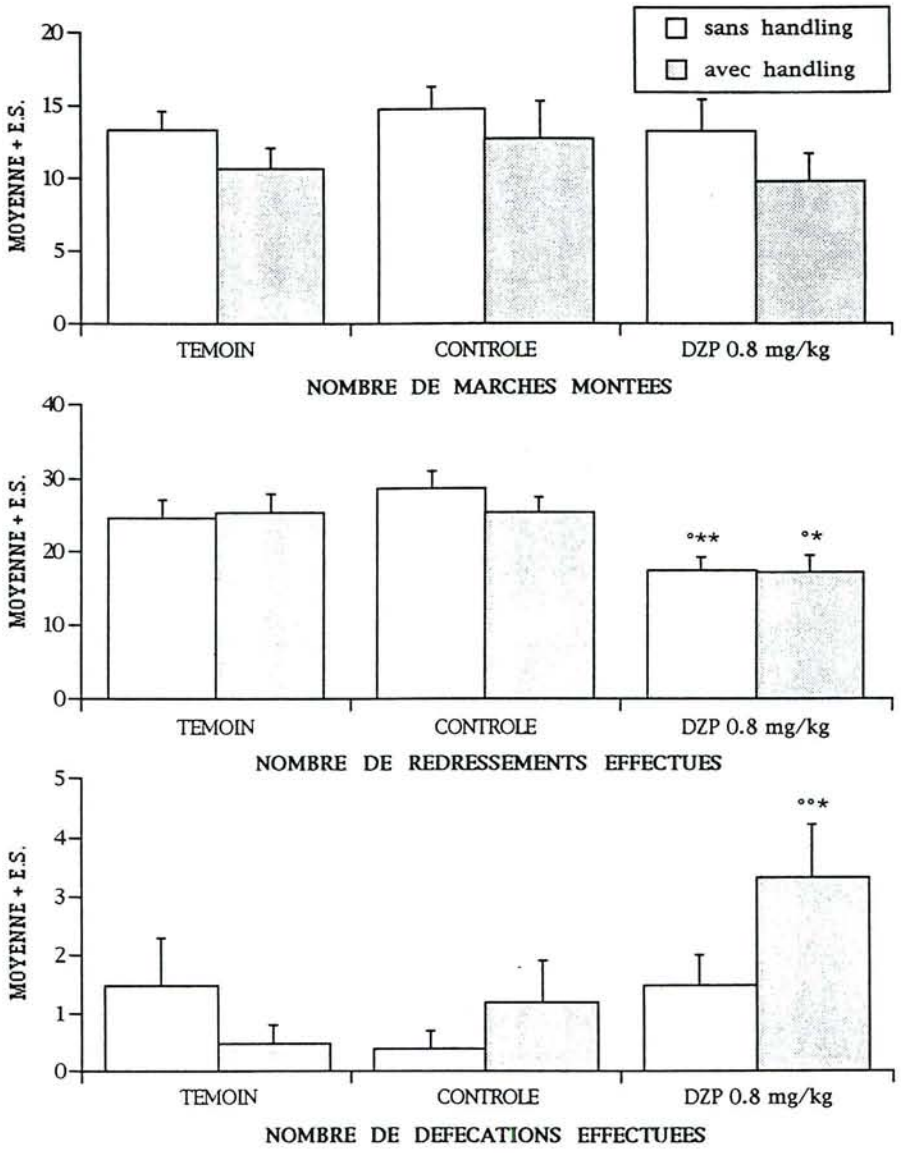


Figure 70: Expérience n°16B: Influence du handling sur les effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées (haut), de redressements (milieu) et de défécations (bas) effectués. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin correspondant; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

G. Expérience n°16B : Influence du handling sur les effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 70 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  - * Lots témoins : NaCl 9‰ (N = 12 sans handling et N = 13 avec handling) ;
  - * Lot contrôles : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12 sans handling et N = 12 avec handling) ;
  - * Lots traités avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 12 sans handling et N = 9 avec handling), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

La procédure de handling a consisté à peser chaque rat 2 fois par semaine, c'est-à-dire 4 fois avant l'expérience, la dernière pesée ayant lieu 24 h avant l'expérience. Les lots sans handling sont pesés une seule fois, 24 h avant l'expérience. De plus, chaque rat des lots avec handling est disposé individuellement dans une cage inconnue, pendant 1 h, une fois par semaine, c'est-à-dire 3 fois en tout, le dernier séjour ayant lieu le jour de l'expérience, pendant l'intervalle séparant le traitement du test. Les rats sans handling séjournent dans la cage individuelle une seule fois, le jour de l'expérience, pendant l'intervalle séparant le traitement du test.

2. Résultats

Etant donné l'hétérogénéité des résultats obtenus avec le DZP lors de l'expérience n°15B, nous avons tenté d'améliorer la reproductibilité des résultats en modifiant la durée du séjour des animaux au laboratoire avant l'expérimentation. En effet, les animaux utilisés dans la série d'expériences précédente n'avaient disposé que d'1 semaine d'habituation aux conditions du laboratoire, avant l'expérience. Cette durée nous ayant semblé insuffisante, nous avons testé le DZP avec des rats ayant séjourné pendant 2 semaines dans la salle d'expérimentation. De plus, la moitié des rats a subi une procédure de handling pendant les 2 semaines précédant l'expérience, afin de vérifier l'existence d'une incidence de la manipulation préalable des animaux sur leur comportement dans le test de l'escalier, avec ou sans traitement benzodiazépinique.

Le Tableau 46 présente les résultats obtenus pour chaque paramètre pris en compte. Ces données ont été analysées à l'aide du test de Kruskal-Wallis et ont donné les résultats suivants (DDL = 5, N = 70) :

- ASC1 : H = 10.88 ; N.S.
- ASC2 : H = 5.05 ; N.S.
- ASC3 : H = 4.47 ; N.S.
- TOTASC : H = 4.90 ; N.S.
- DESC1 : H = 11.78 ; p = .0379
- DESC2 : H = 10.12 ; N.S.
- DESC3 : H = 1.96 ; N.S.
- TOTDESC : H = 6.02 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 5.47 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 8.85 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 15.96 ; p = .007
- R+Rp3 : H = 18.10 ; p = .0028
- TOTRR : H = 18.37 ; p = .0025
- DEF1 : H = 12.93 ; p = .024
- DEF2 : H = 12.90 ; p = .0243
- DEF3 : H = 3.35 ; N.S.
- TOTDEF : H = 13.64 ; p = .018
- TOIL1 : H = 8.90 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.61 ; N.S.
- TOIL3 : H = 3.61 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 2.76 ; N.S.
- LAT M1 : H = 9.72 ; N.S.
- LAT M5 : H = 10.51 ; N.S.

En ce qui concerne les 3 lots sans handling, on n'observe pas de différence statistiquement significative entre les lots témoin et contrôle, en dehors d'une augmentation statistiquement significative du nombre de redressements pendant la deuxième mn du test, pour le lot contrôle (Tableau 46). Un effet de type anxiolytique est observé avec 0.8 mg de DZP par kg : En effet, le nombre de marches montées n'est pas modifié, alors que le nombre de redressements diminue de façon statistiquement significative dans le lot traité avec le DZP, par rapport au lot contrôle (Figure 70). La diminution du nombre total de redressements est significative à la fois par rapport au lot contrôle et par rapport au lot témoin (Tableau 46). Lorsqu'on sépare les redressements effectués minute par minute, on constate que la diminution provoquée par le DZP est significative pendant les 2 dernières minutes du test, par rapport au lot contrôle (Tableau 46). Par ailleurs, on observe une augmentation du nombre de défécations avec le DZP, par rapport au lot contrôle, cette augmentation atteignant le niveau de significativité statistique uniquement pendant la première minute du test (Tableau 46).

En ce qui concerne les 3 lots ayant subi la procédure de handling, on n'observe aucune différence statistiquement significative entre les lots témoin et contrôle (Tableau 46). De même que dans les lots sans handling, on observe que le DZP induit une diminution du nombre de redressements, ne s'accompagnant pas d'une diminution du nombre de marches montées (Figure 70) ou descendues (Tableau 46). Le lot traité avec 0.8 mg de DZP par kg effectue significativement moins de redressements que le lot contrôle, pendant la deuxième minute du test et pendant la

EXPERIENCE	n° 1				n° 2				n° 3			
TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,4	0,4	2,2	0,6	4,2	0,5	4,5	0,5	2,8	0,5	2,5	0,5
ASC2	5,4	1,0	3,3	0,7	4,1	0,6	4,3	0,9	4,1	0,5	3,5	0,6
ASC3	5,8	1,0	4,3	1,1	4,3	0,8	3,0	1,0	4,8	0,6	3,3	0,8
TOTASC	14,6	2,0	9,8	1,9	12,5	1,3	11,8	1,8	11,8	0,7	9,3	1,3
DESC1	1,8	0,4	1,7	0,4	1,8	0,6	3,9 **	0,4	0,6	0,3	1,5 *	0,4
DESC2	5,1	0,8	2,0 *	0,7	3,6	0,6	3,5	1,0	4,5	0,6	3,1	0,5
DESC3	5,4	0,8	4,5	1,1	4,9	0,7	2,6 *	0,9	4,7	0,7	2,8	0,5
TOTDESC	12,3	1,8	8,2	2,0	10,4	1,2	10,0	1,4	9,8	0,9	7,5	1,1
MARCHES TOT	26,8	3,8	18,0	3,8	22,9	2,5	21,8	3,2	21,5	1,5	16,8	2,4
RED1	2,2	0,5	1,6	0,6	1,7	0,5	0,6	0,3	1,7	0,3	0,5 **	0,2
RED2	5,3	0,9	3,1	0,9	4,8	0,7	2,2 *	0,7	3,5	0,9	2,3	0,5
RED3	5,9	0,3	3,0 **	0,6	6,4	1,2	2,0 **	0,8	4,8	0,6	2,7 *	0,7
TOTRED	13,4	1,5	7,7 *	1,2	12,9	1,1	4,8 **	1,5	9,9	1,2	5,5 *	1,0
Rp1	7,0	0,8	4,7 *	0,6	6,7	0,6	5,8	0,5	7,8	0,9	5,8	0,5
Rp2	5,8	0,7	3,7	0,6	5,0	0,6	3,1 *	0,5	6,3	0,8	4,6 *	0,5
Rp3	5,7	0,5	3,7 *	0,7	5,5	0,7	2,2 **	0,4	7,1	0,8	3,1 **	0,6
TOTRp	18,5	1,5	12,1 **	1,1	17,3	1,3	11,1 **	1,1	21,2	1,4	13,5 ***	1,0
R+Rp1	9,2	0,7	6,3 **	0,5	8,5	0,9	6,4	0,7	9,4	1,0	6,4 *	0,6
R+Rp2	11,2	0,8	6,8 **	1,1	9,8	1,1	5,3 **	0,8	9,8	1,0	6,9 **	0,4
R+Rp3	11,6	0,7	6,7 **	1,1	11,9	1,6	4,2 **	1,0	11,8	1,0	5,8 **	1,1
TOTRR	31,9	1,5	19,8 ***	2,0	30,2	2,1	15,9 ***	2,0	31,1	2,2	19,1 ***	1,4
DEF1	0,1	0,1	0,8	0,4	0,5	0,3	0,5	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1
DEF2	0,2	0,2	1,3	0,6	0,6	0,4	0,4	0,3	0,0	0,0	0,2	0,2
DEF3	0,7	0,3	0,5	0,2	0,5	0,4	0,6	0,4	0,0	0,0	0,8	0,4
TOTDEF	0,9	0,4	2,6	1,0	1,6	0,7	1,5	0,6	0,0	0,0	1,1 *	0,5
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,6	0,3	0,1	0,1	0,4	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	0,2	0,1
TOIL3	0,8	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2
TOTTOIL	1,4	0,3	0,4 *	0,2	0,8	0,3	0,8	0,3	0,7	0,2	0,6	0,2
LAT M1	34,3	13,7	30,6	10,8	18,5	3,9	14,6	2,0	32,6	6,3	29,9	4,8
LAT M5	90,4	14,0	138,7 *	16,4	112,5	18,3	98,5	19,5	133,1	18,3	131,7	16,8

Tableau 47: Expérience n°17B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney). N = 10 à 13 par lot.

EXPERIENCE	n° 4				n° 5				n° 6			
TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	4,0	0,5	4,8	0,9	3,7	0,6	3,1	0,5	2,4	0,6	2,9	0,5
ASC2	6,9	0,6	6,3	0,9	6,8	0,5	3,8 *	0,9	4,0	0,9	4,6	0,9
ASC3	6,4	0,7	5,6	1,0	5,4	0,3	3,5	0,8	4,3	0,8	3,0	0,7
TOTASC	17,3	0,9	16,7	2,0	15,8	1,1	10,3 *	1,7	10,7	1,8	10,5	1,4
DESC1	2,8	0,7	3,4	0,6	1,7	0,4	1,4	0,5	1,2	0,3	2,1	0,5
DESC2	6,1	0,5	5,9	0,7	5,6	0,9	4,1	0,7	3,6	0,8	4,2	0,6
DESC3	6,6	0,8	6,0	0,9	5,8	0,6	3,2 *	0,7	3,0	0,7	3,5	0,7
TOTDESC	15,5	1,2	15,3	1,8	13,0	1,1	8,7 *	1,4	7,8	1,6	9,8	1,4
MARCHES TOT	32,8	2,0	32,0	3,8	28,8	2,1	19,0 *	3,1	18,4	3,4	20,3	2,8
RED1	0,9	0,2	0,7	0,3	2,0	0,6	0,6 *	0,3	0,7	0,3	0,2	0,1
RED2	4,1	1,0	2,7	0,7	4,6	0,6	2,0 **	0,6	3,5	0,7	1,4 *	0,4
RED3	4,1	0,6	2,6	0,6	7,3	1,0	2,4 **	0,7	4,6	0,9	1,8 *	0,5
TOTRED	9,1	1,2	6,1	1,0	13,9	1,8	5,0 ***	1,1	8,8	1,3	3,4 **	0,8
Rp1	9,9	0,7	8,2	0,8	7,6	0,5	7,5	0,7	7,0	0,8	5,4	0,7
Rp2	8,2	0,6	5,3 **	0,8	8,8	0,7	5,0 **	0,7	7,4	0,9	5,0	0,7
Rp3	9,2	0,8	5,1 **	0,7	6,7	0,5	3,5 **	0,7	6,8	1,0	3,5 *	0,5
TOTRp	27,2	1,5	18,5 ***	1,4	23,1	1,2	16,0 **	1,5	21,2	2,2	13,9 *	1,3
R+Rp1	10,8	0,8	8,9	0,7	9,6	0,8	8,1	0,7	7,7	0,8	5,6	0,6
R+Rp2	12,2	1,2	8,0 **	0,9	13,4	0,9	7,0 ***	0,7	10,9	1,1	6,4 **	0,9
R+Rp3	13,2	1,1	7,7 **	0,9	14,0	1,1	5,9 ***	1,2	11,3	1,5	5,3 ***	0,8
TOTRR	36,3	2,1	24,6 ***	1,8	37,0	2,3	21,0 ***	1,8	29,9	3,0	17,3 **	1,9
DEF1	0,6	0,4	0,9	0,4	0,0	0,0	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2
DEF3	0,5	0,4	0,8	0,4	0,6	0,3	0,4	0,3	1,0	0,4	0,3	0,3
TOTDEF	1,3	0,7	2,2	0,9	0,8	0,4	1,1	0,5	1,4	0,6	0,5	0,3
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,1	0,1	0,5 *	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,0	0,0
TOIL3	0,4	0,1	0,4	0,2	0,3	0,1	0,6	0,1	0,2	0,1	0,4	0,1
TOTTOIL	0,5	0,2	0,8	0,2	0,3	0,1	0,7	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1
LAT M1	29,2	4,7	16,7	2,3	29,5	4,4	40,0	13,5	53,3	17,1	37,8	13,5
LAT M5	89,0	12,5	82,6	15,4	97,3	10,8	120,8	16,7	132,0	16,6	117,4	18,2

Tableau 47 suite: Expérience n°17B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney). N = 10 à 13 par lot.

durée totale du test (Tableau 46). Donc, nous obtenons le même type de résultats que dans les lots sans handling, c'est-à-dire que d'une part, le véhicule d'injection ne modifie pas les paramètres considérés et que d'autre part, le DZP provoque une diminution statistiquement significative du nombre de redressements effectués à une dose où le nombre de marches montées n'est pas modifié. Ce profil correspond à un effet de type anxiolytique du DZP.

Afin d'évaluer les effets du handling, comparons, 2 à 2, les lots ayant reçu le même traitement, mais ayant subi ou non la procédure de handling (Tableau 46). Dans ce cas, on note que la seule différence atteignant le niveau de significativité statistique est une diminution du nombre de marches descendues pendant la première mn du test dans le lot ayant subi la procédure de handling et reçu une injection de DZP, par rapport au lot sans handling ayant reçu le même traitement. Chez la souris, il a été montré que le handling augmentait l'activité locomotrice (dans Misslin *et al.*, 1976). Dans l'expérience présente, les lots témoin et contrôle sans handling semblent au contraire, plus actifs que les lots avec handling et la latence de montée des marches 1 et 5 est plus courte dans les lots sans handling que dans les lots avec handling, mais ces différences ne sont pas significatives du point de vue statistique. Le handling semble donc induire une légère diminution de l'activité locomotrice, mais n'a aucune incidence sur les changements comportementaux provoqués par le DZP. En effet, dans cette expérience, le handling n'a pas induit de changements majeurs dans le comportement des animaux dans le test de l'escalier. Nous avons observé, avec ou sans handling, un effet de type anxiolytique avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Ceci est en désaccord avec les observations de Boix *et al.* (1988) qui ont montré une disparition de l'effet anxiolytique des benzodiazépines chez les rats habitués au handling. Ce désaccord pourrait provenir de la différence de procédure de handling utilisée. En effet, la procédure de handling employée par Boix *et al.* (1988) était plus intense : Elle durait 15 jours et consistait en une pesée par jour, une injection i.p. de solvant par jour, suivie d'une introduction forcée de la tête de l'animal entre les lames d'une guillotine utilisée normalement pour le sacrifice des animaux, ceci pendant environ quinze secondes. Tout de suite après cette séquence, les animaux étaient remis dans leur cage d'habitation. La procédure que nous avons employée était plus légère et n'était peut-être pas suffisante pour induire des modifications des effets du DZP.

Si l'on compare les résultats de cette expérience avec les précédentes, on remarque que, contrairement à l'expérience n°14B où le DZP (0.1-0.4 mg/kg) était également administré 60 mn avant le test et n'avait provoqué aucune modification comportementale, nous observons, dans l'expérience présente, un effet de type anxiolytique avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Cet effet est caractérisé par une diminution statistiquement significative du nombre de redressements sans modification du nombre de marches montées (Figure 70). D'autre part, par rapport à

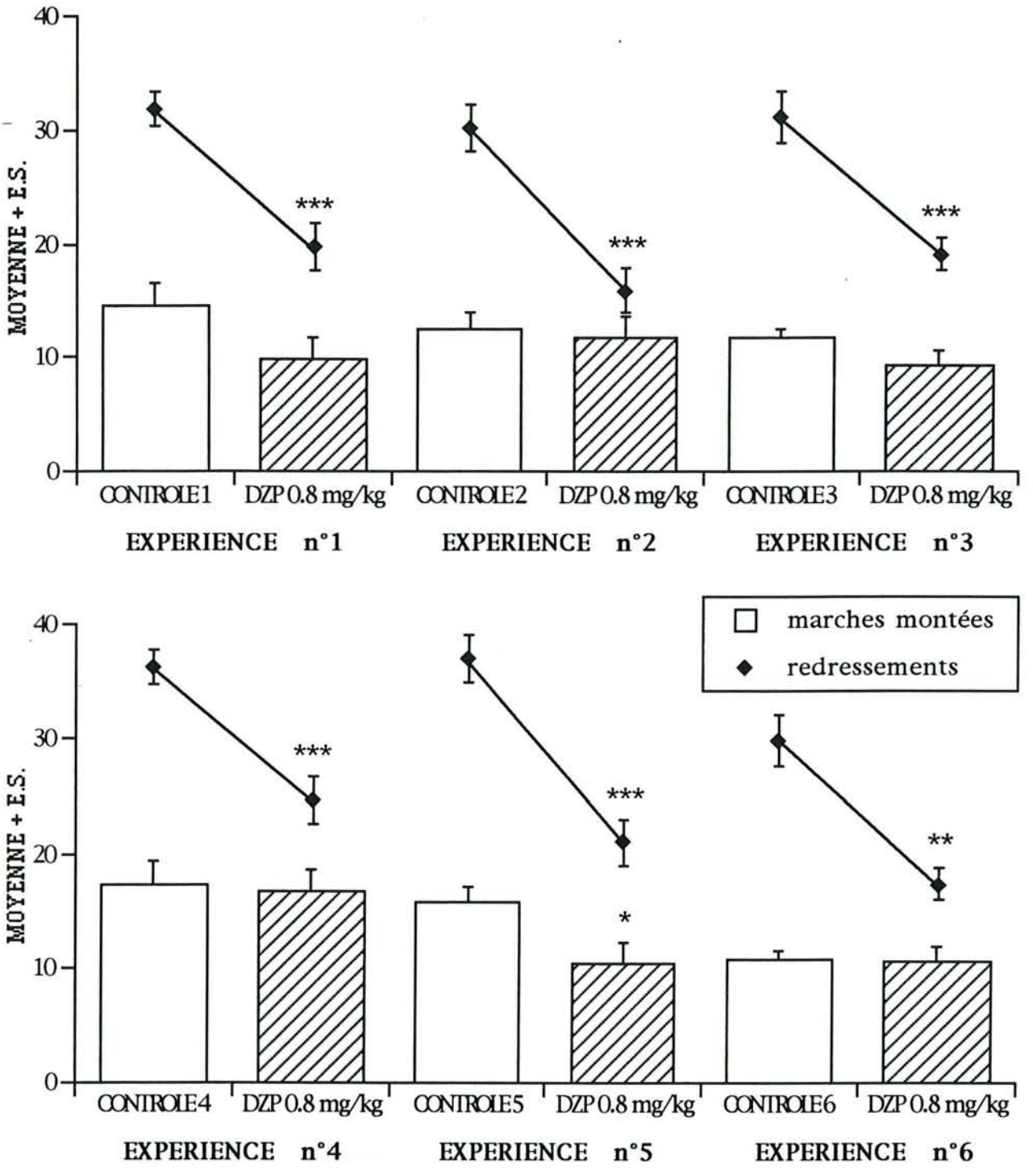


Figure 71: Expérience n°17B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

l'expérience n°15B, la seule différence de procédure est la durée de la période d'habituation aux conditions du laboratoire (expérience n°15B : 1 semaine ; expérience n°16B : 2 semaines). La comparaison de ces 2 expériences suggère qu'une période d'habituation préalable de 2 semaines soit préférable et permette l'obtention d'effets plus nets et plus reproductibles avec le DZP, qu'une période d'une semaine.

H. Expérience n°17B : Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 140 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  - * Lots contrôles : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N1 = 12, N2 = 11, N3 = 12, N4 = 13, N5 = 12, N6 = 12) ;
  - * Lots traités avec le DZP : 0.8 mg/kg (N1 = 10, N2 = 10, N3 = 13, N4 = 11, N5 = 12, N6 = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Les résultats des 6 expériences successives sont reportés dans le Tableau 47. Dans chaque expérience, les données obtenues avec le lot traité avec 0.8 mg de DZP par kg de poids corporel ont été comparées à celles du lot contrôle par le test de Mann-Whitney dont les résultats sont exposés dans le Tableau 47. Dans les 6 expériences, on note que les défécations, toilettages et latences de montée des première et dernière marches sont très peu modifiés par le DZP, du point de vue statistique. Les seules différences statistiques relevées, en ce qui concerne ces 3 paramètres, sont les suivantes : Le nombre total de défécations est significativement supérieur avec le DZP par rapport au lot contrôle, dans la troisième expérience ; Dans l'expérience n°1, le DZP diminue significativement le nombre total de toilettages, alors que dans l'expérience n°4, le DZP augmente significativement leur nombre pendant la deuxième mn du test ; La latence de montée de la dernière marche de l'escalier est significativement augmentée par le DZP dans la première expérience. La latence de montée de la première et de la dernière marche est cependant plus courte avec le DZP dans la majorité des expériences (5 sur 6 pour la première marche

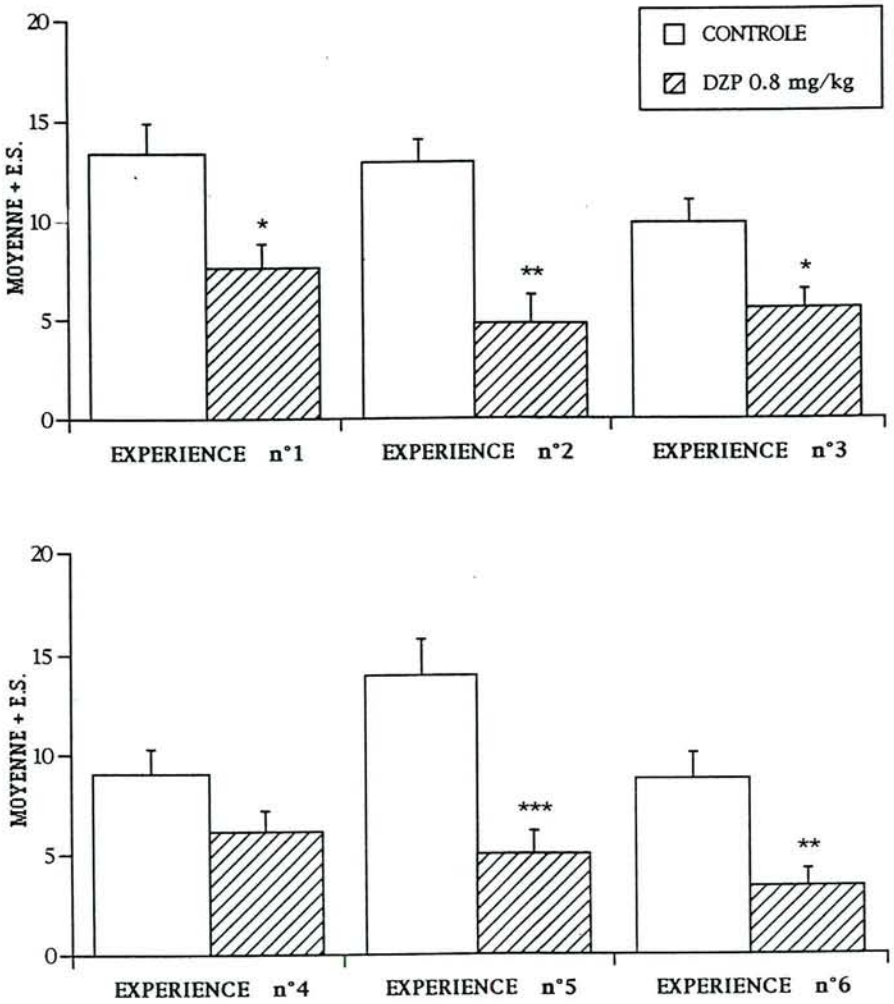


Figure 72: Expérience n°17B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

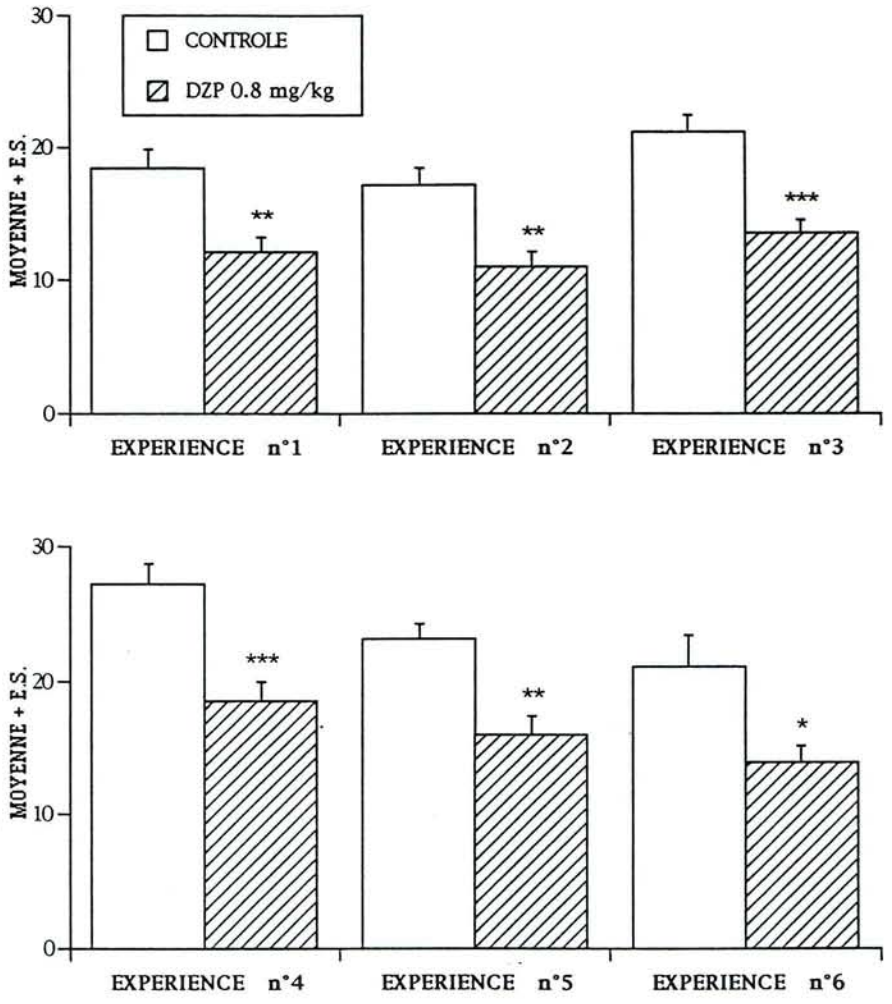


Figure 73: Expérience n°17B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

et 4 sur 6 pour la dernière). Les animaux traités avec le DZP semblent donc montrer moins d'appréhension à monter les marches d'un escalier que les contrôles. Les défécations et toilettages sont très peu nombreux, pendant les 3 mn du test. Des altérations nettes de ces paramètres par les divers traitements sont, par conséquent, difficiles à mettre en évidence.

En ce qui concerne l'activité locomotrice, soit le nombre total de marches montées n'est pas modifié statistiquement par le DZP mais a tendance à diminuer légèrement (dans 5 expériences sur 6), soit il est diminué par le DZP d'une manière statistiquement significative (expérience n°5 ; Figure 71). Le nombre de marches descendues est proche du nombre de marches montées et suit à peu près la même évolution, sauf dans la dernière expérience où il a tendance à être supérieur dans le lot traité avec le DZP par rapport au lot contrôle sans atteindre le niveau de significativité statistique. Ainsi, quand ils sont arrivés en haut des marches, ni les rats contrôles, ni les rats traités avec le DZP n'ont tendance à y rester. Les rats montent et descendent en moyenne 2 à 3 fois l'escalier de 5 marches pendant le test.

Les paramètres comportementaux qui sont le plus affectés par le DZP sont les redressements (Tableau 47). Le nombre total de redressements des 2 types effectués est diminué d'une manière statistiquement significative dans les 6 expériences (Figure 71). Si l'on sépare les redressements avec les pattes antérieures en l'air des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, on remarque que les premiers sont significativement diminués dans 5 expériences sur 6 (Figure 72), alors que la diminution des seconds atteint le niveau de significativité statistique dans les 6 expériences (Figure 73). Lorsqu'on dénombre les redressements mn par mn (Tableau 47), on remarque que la diminution est plus marquée pendant la deuxième et surtout pendant la troisième mn du test. Les redressements avec les pattes antérieures en l'air sont de plus en plus fréquents au cours du test, alors que les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif sont de moins en moins fréquents. En nombre total, les redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif sont cependant toujours plus fréquents que les autres. Au cours des observations, nous avons remarqué que les rats semblaient avoir moins d'appréhension à effectuer des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, qu'à se redresser avec les pattes antérieures en l'air. Cette différence transparaît dans les résultats puisque les premiers sont beaucoup plus fréquents que les seconds.

En résumé, le DZP a induit dans l'ensemble des expériences, tout comme dans l'expérience n°16B, une diminution statistiquement significative des redressements à une dose ne modifiant pas significativement le nombre de marches montées. Il s'agit donc d'un effet de type anxiolytique ne s'accompagnant pas d'effets secondaires indésirables. La dose de 0.8 mg/kg en traitement i.v. une h avant le test

EXPERIENCE	n° 1						n° 2				n° 3			
TRAITEMENT	CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		DZP 1.6 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg		CONTROLE		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	4,3	0,4	6,8 **	0,7	4,5 a	0,7	3,2	0,4	5,0	0,8	4,4	0,8	4,6	0,7
ASC2	5,2	0,6	7,2 *	0,6	5,3	0,8	5,3	0,9	6,9	1,0	5,8	0,7	6,1	1,0
ASC3	8,1	0,8	7,1	1,3	6,5	1,0	5,5	0,9	6,5	0,6	7,3	0,7	7,4	1,0
TOTASC	17,6	1,1	21,1	2,1	16,2	1,4	13,9	1,7	18,5	1,9	17,4	1,7	18,1	1,7
DESC1	1,7	0,6	3,7	0,8	2,2	0,6	1,6	0,4	3,8 *	0,8	2,3	0,5	2,5	0,6
DESC2	5,4	0,7	8,4 *	1,0	4,9 a	0,9	4,9	0,8	6,5	0,9	6,5	1,0	6,1	0,7
DESC3	7,4	0,6	6,5	1,3	6,9	1,0	4,8	0,7	6,6	0,6	6,9	0,8	7,8	1,0
TOTDESC	14,5	1,0	18,5	2,3	14,0	1,4	11,3	1,5	17,0 *	1,8	15,7	2,0	16,3	1,6
MARCHES TOT	32,1	2,0	39,6	4,3	30,2	2,7	25,2	3,1	35,5 *	3,6	33,1	3,7	34,4	3,3
RED1	1,2	0,4	3,2 **	0,5	1,9	0,7	2,5	0,4	2,0	0,4	1,8	0,5	1,3	0,4
RED2	3,1	0,6	4,1	0,6	3,5	0,6	6,2	0,9	6,8	1,0	5,3	0,6	5,1	0,9
RED3	4,8	0,7	5,3	0,5	4,9	1,2	7,5	0,9	5,2 *	0,6	6,9	0,9	6,1	0,6
TOTRED	9,1	1,2	12,5	1,0	10,4	2,2	16,2	1,1	14,0	1,5	14,0	1,2	12,4	1,4
Rp1	9,0	0,6	8,3	0,7	7,4 *	0,5	10,2	0,6	8,2 *	0,4	9,8	0,8	9,6	1,1
Rp2	6,7	0,9	5,4	0,8	4,6	0,6	6,8	0,5	6,6	0,5	7,7	0,6	7,2	0,7
Rp3	7,2	0,7	5,4 *	0,5	4,9 *	0,6	6,7	0,7	5,1	0,8	7,0	0,8	6,8	0,4
TOTRp	22,8	1,6	19,0	1,1	16,9 *	0,9	23,7	1,2	19,9	1,4	24,4	1,1	23,5	1,6
R+Rp1	10,2	0,8	11,5	0,7	9,3	0,8	12,7	0,8	10,2 *	0,5	11,6	0,9	10,8	1,3
R+Rp2	9,8	0,9	9,5	0,8	8,2	0,7	13,1	0,7	13,5	1,2	12,9	0,7	12,3	1,3
R+Rp3	12,0	0,9	10,6	0,8	9,8	1,4	14,2	1,3	10,2 **	0,8	13,9	1,3	12,8	0,6
TOTRR	31,9	1,8	31,5	1,7	27,3	2,3	39,9	1,8	33,9 *	2,3	38,4	1,8	35,9	2,5
DEF1	0,3	0,2	1,3	0,5	0,5	0,3	0,5	0,2	0,7	0,3	0,4	0,2	0,8	0,3
DEF2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,8	0,4	0,7	0,4	1,1	0,4	1,4	0,6
DEF3	0,3	0,3	0,6	0,5	0,5	0,3	1,2	0,6	0,9	0,3	0,5	0,3	0,8	0,4
TOTDEF	0,8	0,7	2,2	0,6	1,2 *	0,3	2,5	0,8	2,3	0,7	2,0	0,7	3,0	1,0
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
TOIL2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,8	0,2	0,2 *	0,2	0,3	0,2	0,5	0,2
TOIL3	1,1	0,3	0,5	0,2	0,6	0,2	0,8	0,2	0,8	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2
TOTTOIL	1,4	0,3	0,9	0,3	1,2	0,2	1,6	0,2	1,0	0,3	0,8	0,2	1,1	0,3
LAT M1	24,1	2,8	14,4 *	2,7	16,1 *	2,1	31,3	5,0	14,5 *	3,2	20,9	3,6	21,1	7,6
LAT M5	92,3	15,6	70,5	16,5	66,2	8,5	136,1	11,5	76,8 *	17,2	97,1	15,2	69,9	13,4

Tableau 48: Expérience n°18B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle correspondant; a: $p < .05$ par rapport à 0.8 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 11 à 13 par lot.

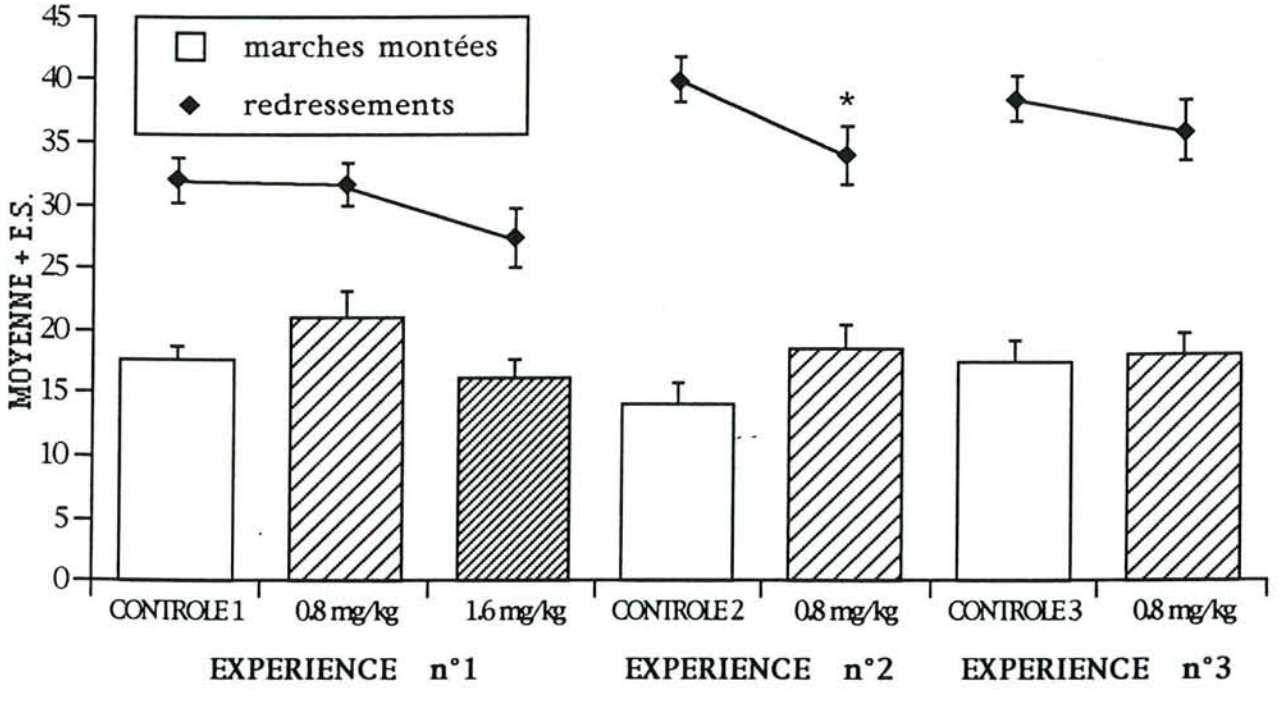


Figure 74: Expérience n°18B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

semble donc satisfaisante pour obtenir un effet de type anxiolytique reproductible avec le DZP. Par conséquent, cette dose de DZP sera administrée à un lot d'animaux dans chacune des expériences réalisées avec les SLC, afin de vérifier que les conditions expérimentales journalières permettent la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique.

I. Expérience n°18B : Effets du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10% chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 84 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 120 mn avant le test :
  - * Lots contrôles : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N1 = 12, N2 = 13, N3 = 12) ;
  - * Lots traités avec le DZP : 0.8 mg/kg (N1 = 11, N2 = 13, N3 = 12) ; 1.6 mg/kg (N1 = 11), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Les expériences avec les SLC nécessitant une étude des effets dans le temps et afin d'évaluer les effets du DZP en fonction du temps, nous avons reproduit l'expérience précédente, toujours avec le DZP, mais en rallongeant d'une h la durée séparant le traitement du test. Dans la première expérience, nous avons employé 2 doses de DZP (0.8 et 1.6 mg/kg) afin de réaliser une courbe dose-réponse.

Les résultats des 3 expériences successives sont regroupés dans le Tableau 48. Dans chaque expérience, les données obtenues avec le lot traité avec 0.8 (ou 1.6 pour la première expérience) mg de DZP par kg de poids corporel ont été comparées à celles du lot contrôle par le test de Mann-Whitney dont les résultats sont reportés dans le Tableau 48.

En ce qui concerne le nombre de marches montées, on observe une modification statistiquement significative uniquement dans la première expérience : Les nombres de marches montées augmentent pendant la première et la deuxième mn du test avec 0.8 mg de DZP par kg par rapport aux contrôles (Tableau 48). Toutefois, l'augmentation du nombre total de marches montées pendant le test

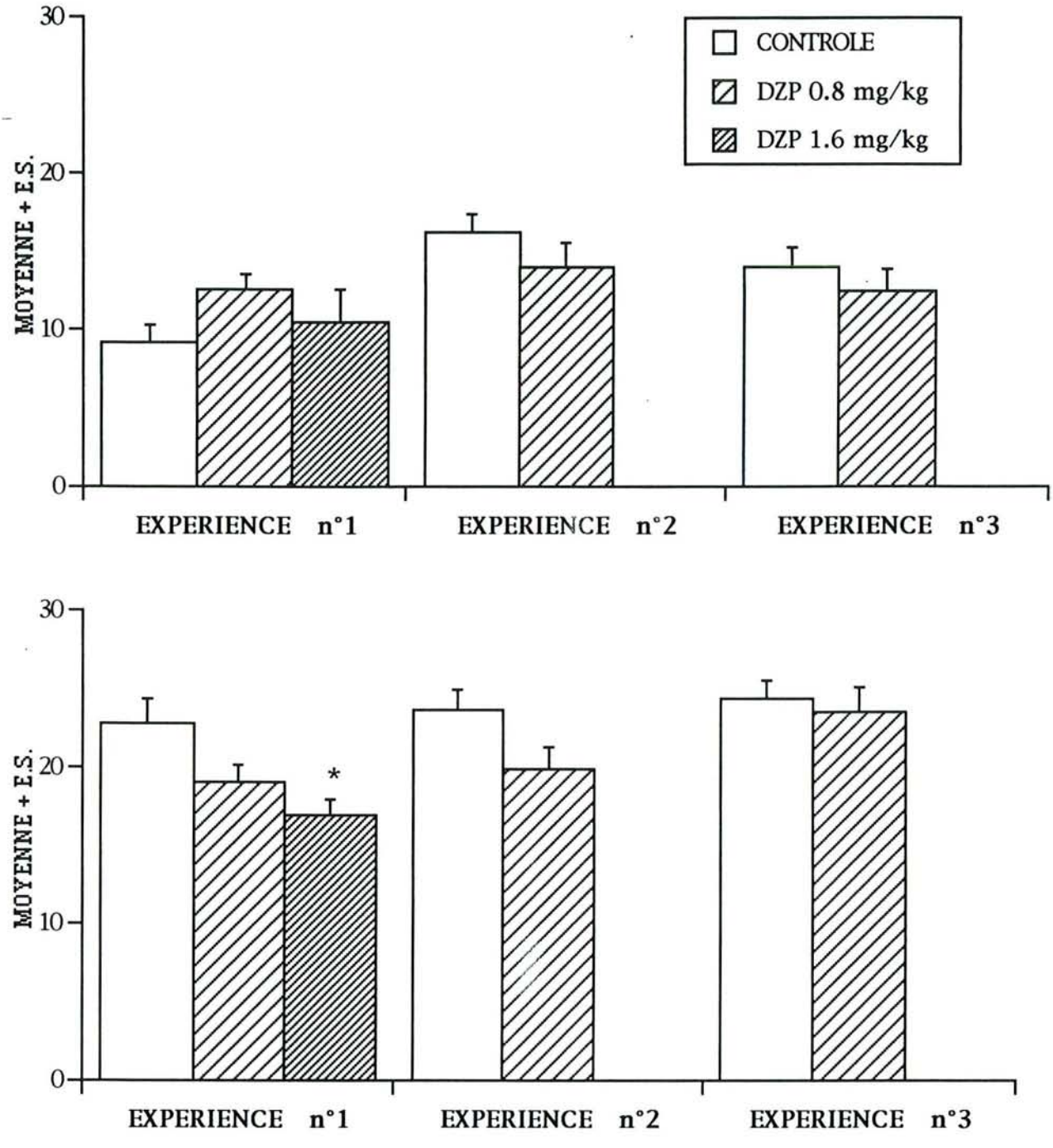


Figure 75: Expérience n°18B: Reproductibilité des effets du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air (haut) et avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi (bas). *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle correspondant (test de Mann-Whitney).

n'atteint pas le niveau de significativité statistique (Figure 74). Cette augmentation a disparu avec la dose de 1.6 mg/kg, dose à laquelle les valeurs sont retournées au niveau des contrôles. Le DZP a également tendance à augmenter le nombre total de marches montées dans les 2 autres expériences, mais d'une manière non significative du point de vue statistique. Le nombre de marches descendues augmente de la même manière que le nombre de marches montées, mais l'augmentation du nombre total de marches montées est statistiquement significative lors de la deuxième expérience. Dans cette expérience, le nombre total de marches montées ou descendues augmente d'une manière significative.

Les redressements sont moins affectés que dans l'expérience n°17B où le DZP était administré 1 h avant le test. Cependant, le nombre total de redressements des 2 types est, là encore, diminué par le DZP, cette diminution étant significative uniquement dans la deuxième expérience (Figure 74). Dans la première expérience, on remarque que cette diminution s'accentue avec l'augmentation de la dose de DZP, mais sans atteindre un niveau statistiquement significatif.

En séparant les 2 types de redressements, on remarque qu'avec la dose de 0.8 mg/kg, les redressements avec les pattes antérieures en l'air ont tendance à augmenter dans la première expérience et à diminuer dans les 2 autres, ces modifications n'étant toutefois pas significatives du point de vue statistique (Figure 75). Dans la première expérience, l'augmentation est significative par rapport aux contrôles pendant la première mn du test alors que dans la seconde expérience, la diminution est significative pendant la troisième mn du test (Tableau 48). La dose de 1.6 mg/kg ramène les valeurs au niveau des contrôles.

En ce qui concerne les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, le DZP, à la dose de 0.8 mg/kg, les diminue d'une manière non significative dans les 3 expériences (Figure 75). La première expérience montre que cette diminution est dose-dépendante, puisqu'elle devient significative à la plus forte dose testée.

Le DZP augmente le nombre de défécations dans la première et la dernière expérience mais les diminue dans la deuxième. Toutefois, ce paramètre présentant des valeurs faibles pendant la durée du test et une grande variabilité inter-individuelle, les modifications ne sont statistiquement significatives qu'avec la dose de 1.6 mg/kg (Tableau 48).

Le DZP raccourcit la latence de montée des marches. Cette diminution est statistiquement significative dans les deux premières expériences pour la première marche de lescalier et dans la deuxième pour la dernière marche de l'escalier (Tableau 48).

En résumé, l'admistration de DZP 2 h avant le test produit toujours une diminution des redressements, mais beaucoup moins marquée que lorsque l'injection était réalisée 1 h avant le test (expériences n°16B et 17B) puisqu'elle n'est plus

significative que dans 1 expérience sur 3 (Figure 74). Lorsqu'on distingue les 2 types de redressements, on remarque que l'effet inhibiteur du DZP sur les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif persiste plus longtemps que son effet sur les redressements avec les pattes antérieures en l'air. En effet, le DZP diminue significativement les premiers après 1 h à la dose de 0.8 mg/kg (Figure 73) et après 2 h à la dose de 1.6 mg/kg (Figure 75). Par contre, il diminue significativement les deuxièmes après 1 h à la dose de 0.8 mg/kg (Figure 72), mais est sans effet significatif après 2 h avec 0.8 et 1.6 mg/kg (Figure 75). En ce qui concerne l'activité locomotrice, de même que lorsque l'injection était réalisée 1 h avant le test, la montée des marches reste inchangée avec 0.8 mg de DZP par kg (Figure 74). Par conséquent, le DZP semble toujours montrer des effets de type anxiolytique sans effets secondaires, 2 h après son administration i.v., puisqu'il tend toujours à diminuer le nombre de redressements effectués sans diminuer le nombre de marches montées qui a même tendance à augmenter. Toutefois, ces effets se sont atténués, deviennent difficilement mesurables et ne sont plus reproductibles. Ils n'atteignent le niveau de significativité statistique que dans 1 expérience sur 3. Il semble donc difficile d'obtenir un effet de type anxiolytique significatif avec le DZP, 2 h après le traitement i.v.. L'administration i.v. favorise une élimination rapide, par rapport à la voie i.p. qui serait peut-être préférable pour l'observation d'effets de longue durée.

J. Discussion

En ce qui concerne les injections i.p. de DZP et ses effets dans le test de l'escalier, qui nécessite un niveau d'activité motrice beaucoup plus élevé que le test de suppression néophobique de la prise de boisson, nous obtenons des résultats sensiblement différents de ceux observés dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson : Chez le rat Wistar, le DZP dissous dans l'éthanol à 10% montre un profil de type anxiolytique aux deux doses les plus élevées testées (2 et 3 mg/kg), alors que lorsqu'il est dissous dans le DMI, il ne montre aucune activité de type anxiolytique car, si elle existe, elle est masquée par la présence d'effets secondaires moteurs. Par contre, le DMI peut être utilisé comme véhicule d'injection du DZP chez le rat Long-Evans, car cette souche semble moins sensible à l'effet déséquilibrant du DMI et des effets de type anxiolytique ont été observés dès la dose de 1 mg de DZP par kg.

Dans les expériences suivantes, les injections ont été réalisées par voie i.v. avec un nouvau véhicule : le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%, qui a été validé pour le test de l'escalier, dans le chapitre précédent. Tout d'abord, nous avons montré que le DZP montrait des effets sédatifs lorsque l'administration était réalisée 30 mn avant le test. Ensuite, l'intervalle entre l'admistration et le test ayant été amené à 60 mn, nous avons montré que le DZP montrait des effets de type anxiolytique à partir de

0.8 mg/kg. Toutefois, ces effets nétaient pas reproductibles d'une expérience à l'autre. Afin d'augmenter la reproductibilité des résultats expérimentaux, la période d'habituation aux conditions du laboratoire avant le test a été doublée (2 semaines au lieu d'1 dans les expériences précédentes). De plus, nous avons évalué l'influence de la manipulation des animaux pendant la période d'habituation. En effet, Boix *et al.* (1988) ont montré une disparition de l'effet anxiolytique des benzodiazépines chez les rats habitués au handling. La procédure de handling que nous avons employée, plus légère que celle employée par Boix *et al.* (1988), n'a pas modifié les effets comportementaux du DZP. Les rats ayant subi la procédure de handling, ainsi que ceux qui ne l'ont pas subie, ont montré un profil de type anxiolytique, ne s'accompagnant pas d'effets secondaires, après une administration de 0.8 mg de DZP par kg de poids corporel. La conclusion de cette expérience est qu'il n'est pas indispensable de soumettre les animaux à une procédure de handling pour obtenir un effet de type anxiolytique avec 0.8 mg de DZP par kg. Par contre, il apparaît qu'un séjour de quinze jours au laboratoire avant l'expérimentation soit préférable à 1 semaine et améliore la reproductibilité des résultats. En effet, dans l'expérience n°17B, nous avons testé la reproductibilité des effets du DZP avec des rats ayant bénéficié de 2 semaines d'adaptation aux conditions du laboratoire et nous avons observé une diminution du nombre de redressements sans modification du nombre de marches montées dans 5 essais sur 6. Dans le sixième, la diminution du nombre de redressements s'accompagnait d'une diminution statistiquement significative du nombre de marches montées. Afin de réaliser une étude des effets du DZP en fonction du temps, le DZP a ensuite été administré 2 h avant le test. Dans ces conditions, le DZP produisait toujours une diminution du nombre de redressements sans modification du nombre de marches montées, mais ce effet était beaucoup moins marqué et n'atteignait le niveau de significativité statistique que dans 1 essai sur 3.

L'ensemble de ces expériences nous a permis de définir les conditions expérimentales nécessaires à la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique dans le test de l'escalier : 2 souches différentes de rats ont été testées, un véhicule dépourvu d'interférences avec l'activité comportementale des rats a été sélectionné pour les injections i.p. et i.v., l'intervalle de temps nécessaire, entre l'administration i.p. ou i.v. et le test, pour l'observation d'effets de type anxiolytique a été défini, la durée de la période d'habituation aux conditions du laboratoire a été ajustée et enfin, l'influence des manipulations préalables des animaux a été évaluée. Les conditions expérimentales ainsi définies avec le DZP, un agent anxiolytique bien connu et largement prescrit, seront employées pour l'évaluation des effets anxiolytiques de nouvelles molécules, les GABA-SLC, dans un chapitre suivant.

CHAPITRE 6

PROPRIETES ANXIOLYTIQUES ET ANTICONVULSIVANTES DU SK&F-89976-A

L'acide nipécotique, le plus puissant inhibiteur de la recapture présynaptique et gliale du GABA connu, ne traverse pas la BHE en raison de sa forme polaire. La fixation d'un groupe 4,4-diphényl-3-butényl sur l'amine de ce petit acide aminé donne un dérivé actif de l'acide nipécotique, le SK&F-89976-A. Ce dernier est un inhibiteur de la recapture du GABA environ 20 fois plus puissant que l'acide nipécotique *in vitro* et est capable de traverser la BHE après administration systémique (Yunger *et al.*, 1984). Son activité anticonvulsivante a été étudiée dans différents modèles animaux où il s'est avéré très efficace (Yunger *et al.*, 1984 ; Schwark & Haluska, 1986 ; Heit & Schwark, 1988). Une activité antinociceptive a été montrée avec ce composé, dans le test d'immersion de la queue chez la souris (Zorn & Enna, 1985). Toutefois, son activité anxiolytique n'a pas encore été étudiée. Ce produit a donc été évalué dans différents modèles animaux, dans les conditions expérimentales mises au point avec les véhicules et le DZP, dans les chapitres précédents.

I. TEST DE SUPPRESSION NEOPHOBIQUE DE LA PRISE DE BOISSON

A. Expérience n°1C : Effet du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p.), dissous dans une solution de DMI à 25% (30 mn)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats mâles Wistar de 300-400 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 8) ;
  * Lots traités avec le SK&F-89976-A : 4 mg/kg (N = 8) ;
    8 mg/kg (N = 8) ;
    16 mg/kg (N = 8), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats - Discussion

Le SK&F-89976-A est un inhibiteur de la recapture du GABA traversant la BHE. Il provoque ainsi, une augmentation du taux de GABA synaptique.

Le Tableau 49 présente les taux de boisson en ml en fonction du traitement. Aucune hétérogénéité n'a été mise en évidence par l'analyse des données par le test de Kruskal-Wallis (DDL = 3 ; N = 32) :

TEMPS (min.)	TRAITEMENT			
	CONTROLE	SK&F-89976-A 4 mg/kg	SK&F-89976-A 8 mg/kg	SK&F-89976-A 16 mg/kg
N	8	8	8	8
15	0.8 ± 0.5	1.2 ± 0.5	1.4 ± 0.4	0.9 ± 0.6
30	0.8 ± 0.5	1.4 ± 0.5	2.5 ± 0.7	1.0 ± 0.6
45	1.8 ± 0.7	2.0 ± 0.7	3.4 ± 0.9	2.8 ± 1.6
60	1.9 ± 0.7	2.2 ± 0.9	3.8 ± 1.1	3.2 ± 1.6

Tableau 49: Expérience n°1C: Effet du SK&F-89976-A (0-16 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

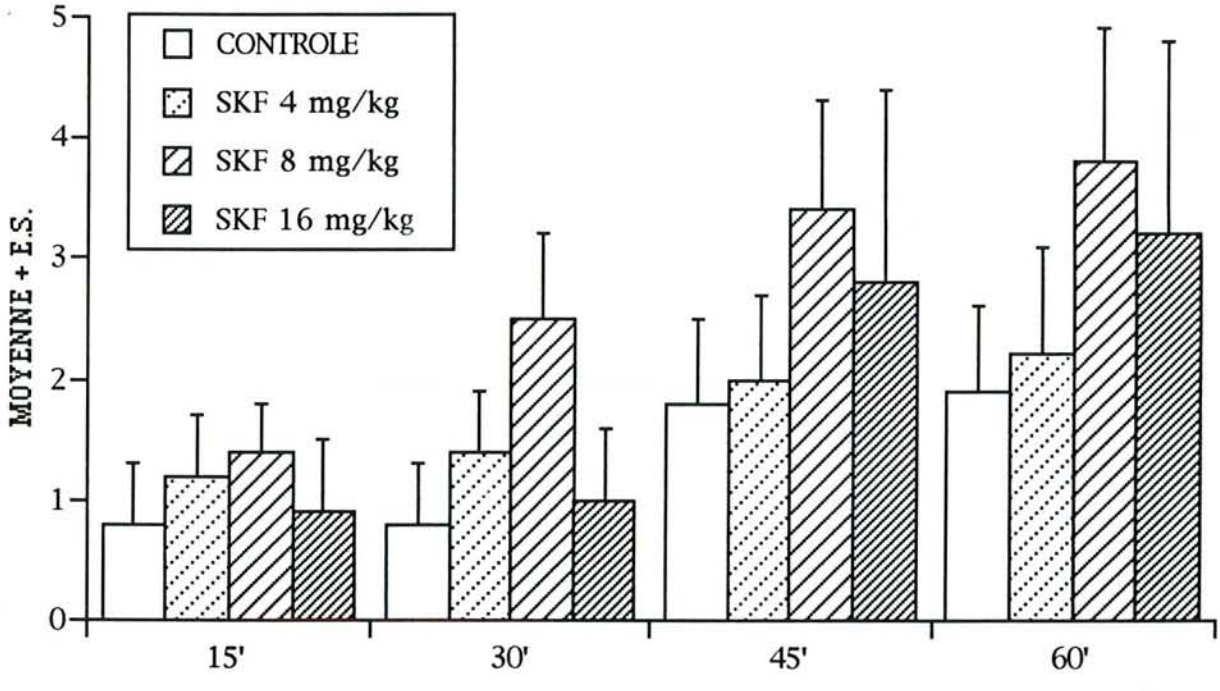


Figure 76: Expérience n°1C: Effet du SK&F-89976-A (0-16 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le taux de boisson (ml) en fonction du temps dans le test du biberon, chez le rat Wistar.

- 15 mn : H = 2.21 ; N.S.
- 30 mn : H = 4,.92 ; N.S.
- 45 mn : H = 1.86 ; N.S.
- 60 mn : H = 2.12 ; N.S.

L'hétérogénéité la plus importante apparaît pour une durée d'expérimentation de 30 mn et n'est significative qu'au risque 10%. Plus précisément, on observe une augmentation, non significative du point de vue statistique, du taux de boisson avec 8 mg de SK&F-89976-A par kg, alors que la dose de 16 mg par kg provoque une légère diminution du taux de boisson par rapport au lot traité avec 8 mg par kg (Figure 76). Cette diminution pourrait être le reflet d'un léger effet sédatif de la substance. Enfin, avec 4 mg par kg, le SK&F n'entraine aucune modification du taux de boisson. Comparé au DZP, qui induit une augmentation statistiquement significative du taux de boisson à partir de 2 mg/kg (Expérience n°3B), le SK&F-89976-A est donc beaucoup moins efficace.

En comparant les lots contrôles des expériences n°2B et 1C, on note une variation importante du taux de boisson moyen, qui est environ deux fois plus élevé dans l'expérience n°2B, alors que les deux lots reçoivent la même injection. Ceci est probablement imputable à la différence de poids corporel (200-250g pour l'expérience n°2B et 300-400g pour l'expérience n°1C) et de provenance des animaux. Les animaux de l'expérience n°1C provenant de l'élevage du laboratoire et ceux de l'expérience n°2B d'un élevage industriel, ces derniers n'ont peut-être pas été suffisamment habitués aux conditions du laboratoire.

Dans les conditions du test, le SK&F-89976-A dissous dans le DMI montre un léger effet anxiolytique à la dose de 8 mg par kg, dose quatre fois supérieure à la dose de DZP produisant un effet de type anxiolytique significatif dans ce test. Il faut cependant noter qu'aux doses testées, le SK&F-89976-A n'a provoqué aucun signe d'activité sédative, ce qui constitue un avantage vis-à-vis des BZD dont les doses anxiolytiques et sédatives sont souvent très proches.

II. TEST DES CONVULSIONS INDUITES PAR LE PTZ

A. Expérience n°2C : Effet du SK&F-89976-A (4-32 mg/kg, i.p.), dissous dans une solution de DMI à 25% (30 mn)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 10 rats mâles Wistar de 300-400 g (IFFA-CREDO).
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.p., à raison de 2 ml de solution par kg de poids corporel, 30 mn avant l'administration de PTZ. Ce dernier, administré à la

TRAITEMENT	PARAMETRE	STADE	LATENCE (mn)	DUREE (mn)
CONTROLE 1	MOYENNE	4,5	2,2	13,8
	ES	0,2	0,2	2,2
SKF 4 mg/kg	MOYENNE	4,1	1,9	30,8 **
	ES	0,1	0,2	4,9
CONTROLE 2	MOYENNE	4,5	2,0	22,0
	ES	0,2	0,5	2,9
SKF 8 mg/kg	MOYENNE	4,0 *	1,7	55,3 ** c
	ES	0,0	0,1	5,6
CONTROLE 3	MOYENNE	4,5	1,7	29,5 d
	ES	0,2	0,1	5,0
SKF 16 mg/kg	MOYENNE	3,8 *	2,5	69,6 ** e
	ES	0,2	0,5	8,5
CONTROLE 4	MOYENNE	4,9 a	1,8	58,3 f
	ES	0,1	0,2	16,7
SKF 32 mg/kg	MOYENNE	2,8 * b	6,1	89,0 g
	ES	0,2	4,4	10,6

Tableau 50: Expérience n°2C: Effet du SK&F-89976-A (4-32 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI sur la latence d'apparition, l'intensité et la durée de la crise comportementale induite par le PTZ. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle précédent; a: $p < .05$ par rapport aux contrôles 2 et 3; b: $p < .05$ par rapport à 4, 8 et 16 mg/kg; c: $p < .01$ par rapport à 4 mg/kg; d: $p < .01$ par rapport au contrôle 1; e: $p < .01$ par rapport à 4 et 8 mg/kg; f: $p < .05$ par rapport au contrôle 1; g: $p < .05$ par rapport à 4 et 8 mg/kg (test de Wilcoxon). N = 10 par lot.

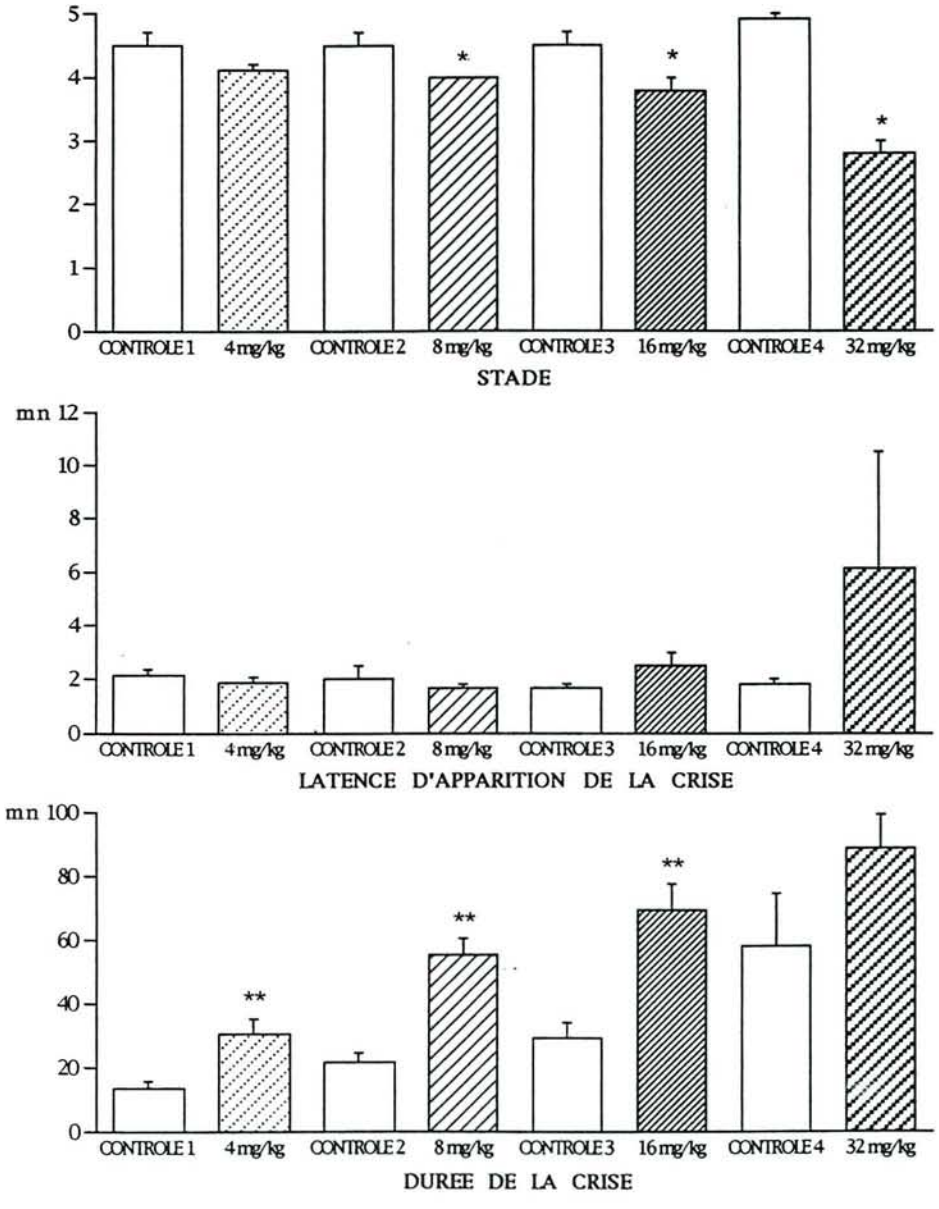


Figure 77: Expérience n°2C: Effet du SK&F-89976-A (4-32 mg/kg, i.p. 30 mn avant le PTZ) en solution dans le DMI sur l'intensité (haut), la latence d'apparition (milieu) et la durée (bas) de la crise comportementale induite par le PTZ. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle précédent (test de Wilcoxon).

dose de 60 mg/kg de poids corporel, est dissous dans le NaCl 9‰ de manière à injecter 2 ml de solution par kg de poids corporel :

* Tests de contrôle : Solution de DMI à 25% (N = 10) ;
* Tests avec le SK&F-89976-A : 4 mg/kg (N = 10) ;
  8 mg/kg (N = 10) ;
  16 mg/kg (N = 10) ;
  32 mg/kg (N = 5), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats - Discussion

Lors du dernier test contrôle, 5 rats sont décédés alors qu'ils effectuaient une crise de stade 5. Le dernier test, avec 32 mg/kg, a donc été réalisé avec un effectif de 5 rats au lieu de 10 dans les tests précédents. Nous ne connaissons pas les raisons de cette importante mortalité, car au cours des tests contrôles précédents, aucun décès n'avait été constaté. Il semblerait que les administrations successives de PTZ augmentent la sensibilité des animaux à ce convulsivant. De la même manière, nous avions déjà remarqué des décès en cours d'expérience dans l'expérience n°5B. Il semble donc judicieux de ne pas trop augmenter le nombre de tests successifs avec les mêmes individus.

Le test de Friedman montre qu'il existe des différences statistiquement significatives entre les tests, pour l'intensité et la durée des crises (DDL =7 ; N = 5) :

- Intensité de la crise : $Chi^2 = 22.28$; p = .003
- Latence d'apparition de la crise : $Chi^2 = 3.33$; NS
- Durée de la crise : $Chi^2 = 25.80$; p = .0005

La latence n'est pas modifiée de façon statistiquement significative au cours des différents tests. Il existe des différences statistiquement significatives entre les différents tests contrôles pour la durée et l'intensité des crises (Tableau 50) : Le contrôle 4 montre une intensité des crises supérieure aux contrôles 2 et 3 et les deux derniers contrôles effectués montrent une durée des crises supérieure au contrôle 1.

En analysant les résultats obtenus dans les tests avec le SK&F-89976-A, nous obtenons une diminution statistiquement significative pour l'intensité des crises, à partir de 8 mg/kg. De plus, le SK&F-89976-A produit, à la dose de 32 mg/kg, une diminution de l'intensité des crises supérieure à celle produite aux doses inférieures. Il y a donc un effet dose-dépendant du SK&F-89976-A sur l'intensité de la crise (Figure 77). Ceci s'applique également à la durée des crises mais d'une manière oppposée. En effet, le SK&F-89976-A modifie significativement la durée des crises aux trois plus faibles doses testées : Plus on augmente la dose de SK&F-89976-A, plus l'effet

du SK&F-89976-A sur la durée diminue, c'est-à-dire plus les crises sont longues, jusqu'à retourner au niveau des contrôles avec 32 mg/kg (Figure 77). En fait, comme nous l'avons vu, la durée des crises augmente également au cours des tests contrôles successifs. Il est donc impossible de distinguer les effets propres du SK&F-89976-A de l'évolution de la durée des crises indépendante du SK&F-89976-A, qui a lieu au cours de l'expérimentation.

Donc, le SK&F-89976-A provoque une diminution dose-dépendante de l'intensité des crises.

Les résultats obtenus dans l'expérience n°2C sont comparables à ceux obtenus dans l'expérience n°5B en ce qui concerne le premier test contrôle (Tableaux 34 et 50). Les rats employés dans ces deux expériences présentaient donc les mêmes caractéristiques en début d'expérience, ce qui nous permet de comparer les effets du SK&F-89976-A à ceux du DZP. Le SK&F-89976-A est beaucoup moins efficace que le DZP pour inhiber les crises induites par le PTZ (environ 16 fois moins) dans les conditions du test (Figures 57 et 77) : Le DZP réduit significativement l'intensité des crises à partir de 0.5 mg/kg (expérience n°5B), alors que 8 mg/kg sont nécessaires pour obtenir une réduction statistiquement significative avec le SK&F-89976-A (expérience n°2C). Yunger *et al.* (1984) ont obtenu une ED_{50} de 6.3 mg/kg i.p. avec le SK&F-89976-A, vis-à-vis de la composante extension des pattes antérieures des crises induites par le PTZ (25 mg/kg i.v.). Ces résultats sont donc assez proches de ceux obtenus dans l'expérience n°2C.

Le SK&F-89976-A a un effet légèrement différent de celui du DZP sur le déroulement des crises comportementales. Comme le DZP, il provoque une diminution de l'intensité (mais beaucoup moins marquée qu'avec le DZP), une augmentation de la latence d'apparition (avec la plus forte dose testée uniquement), mais contrairement au DZP, il a tendance à augmenter la durée de la crise. Le DZP est donc un inhibiteur plus puissant des convulsions induites chimiquement. Cependant, avec le DZP, on observe des effets secondaires (ataxie, sédation et myorelaxation), ce qui n'est pas le cas avec le SK&F-89976-A même à 32 mg par kg. D'autre part, il faut noter que, quelle que soit la dose testée, aucun stade 0 n'a été obtenu avec le SK&F-89976-A, contrairement au DZP. Le SK&F-89976-A semble inhiber uniquement les crises généralisées (c'est-à-dire supérieures au stade 3). Schwark & Haluska (1986) ont montré que ce composé, après administration chronique, inhibait la généralisation des crises induites par embrasement de l'amygdale, mais les crises n'étaient pas complètement inhibées. Heit & Schwark (1988) ont employé le même modèle animal et ont obtenu des résultats similaires : l'intensité minimale obtenue avec le SK&F-89976-A était de 2.3 ± 0.4 selon l'échelle de Racine (1972). D'après ces auteurs, les augmentations des quantités de GABA induites par les inhibiteurs de la recapture du GABA dans des régions subcorticales, telles que la *substantia nigra*, seraient à l'origine de l'activité anticonvulsivante de cette catégorie de substances. Etant donné

TRAITEMENT	CONTROLE		SK&F 4 mg/kg		SK&F 8 mg/kg		SK&F 16 mg/kg		
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE		ES
ASC1	2,5	0,8	1,8	0,4	2,3	0,6	1,3		0,6
ASC2	3,1	0,6	3,3	0,8	4,0	0,8	2,0		0,5
ASC3	4,5	1,0	4,6	0,5	4,4	1,2	2,8		0,7
TOTASC	10,1	1,7	9,6	0,8	10,6	1,5	6,0		1,3
DESC1	0,1	0,1	0,4	0,3	0,4	0,2	0,6		0,4
DESC2	3,3	0,8	2,3	0,8	3,9	0,8	1,8		0,6
DESC3	3,9	0,8	4,0	1,1	4,9	0,8	1,4	*ab	0,7
TOTDESC	7,3	1,5	6,6	1,2	9,1	1,3	3,8	b	0,9
MARCHES TOT	17,4	3,1	16,3	2,0	19,8	2,7	9,8	ab	2,1
R+Rp1	4,0	0,3	4,8	0,8	5,9	0,5	3,9		0,8
R+Rp2	5,8	0,6	5,0	0,9	6,6	0,9	3,5		1,0
R+Rp3	5,4	0,8	5,8	1,2	7,0	1,0	5,1		1,0
TOTRR	15,1	0,9	15,5	2,4	19,5	2,0	12,5		1,9
DEF1	0,6	0,6	0,9	0,6	0,0	0,0	0,3		0,3
DEF2	0,3	0,3	0,9	0,6	0,5	0,3	0,0		0,0
DEF3	0,4	0,4	0,8	0,4	1,0	0,4	0,0		0,0
TOTDEF	1,3	0,8	2,5	1,4	1,5	0,7	0,3		0,3
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0
TOIL2	0,4	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1		0,1
TOIL3	0,5	0,2	0,3	0,2	0,1	0,1	0,4		0,2
TOTTOIL	0,9	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5		0,3
LAT M1	47,4	8,2	54,4	12,1	37,4	5,1	74,8		18,2
LAT M5	119,4	22,6	124,6	13,1	119,3	17,1	147,5		15,5

Tableau 51: Expérience n°3C: Effets du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport à 4 mg/kg; b: $p < .01$ par rapport à 8 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 8 par lot.

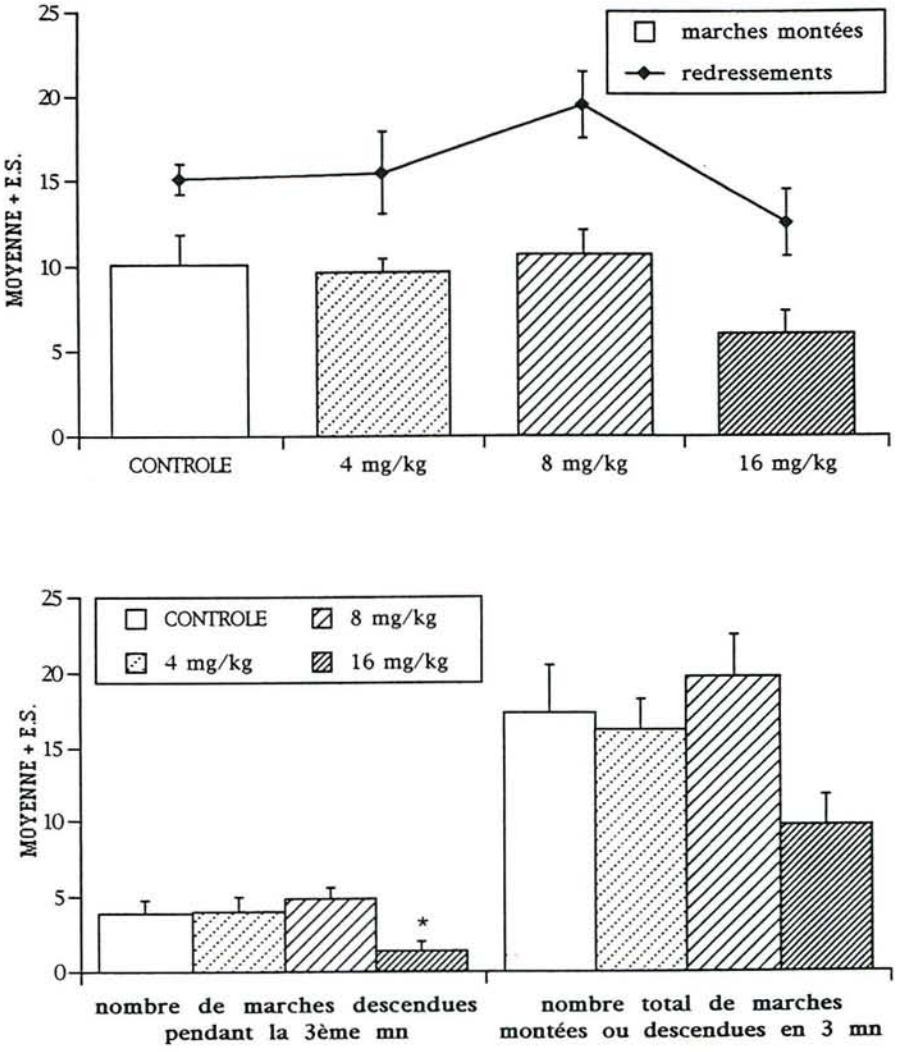


Figure 78: Expérience n°3C: Effet du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le DMI sur le nombre de marches montées et de redressements effectués (haut), sur le nombre de marches descendues pendant la troisième minute du test et sur le nombre total de marches montées ou descendues pendant le test (bas), chez le rat Wistar. *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

que l'activité électrique localisée de crise ne passe pas au niveau de la *substantia nigra*, le médicament est incapable de prévenir les composantes non généralisées de la crise.

En résumé, le SK&F-89976-A montre des propriétés anticonvulsivantes mais celles-ci sont moins importantes que celles du DZP et le SK&F-89976-A inhibe uniquement la composante généralisée de la crise, à l'inverse du DZP qui atteint une inhibition complète de la crise. Par contre, le SK&F-89976-A montre moins d'effets secondaires que le DZP aux doses anticonvulsivantes. Les effets secondaires sédatifs (ataxie, myorelaxation) du DZP apparaissent 1 à 2 mn après l'administration et sont toujours observables au moment de l'administration de PTZ, 30 mn plus tard. Par contre, aucun effet secondaire n'est observable sur l'activité générale avec le SK&F-89976-A, même aux plus fortes doses. Schwark & Löscher (1985) ont fait les mêmes observations à des dosages comparables.

III. TEST DE L'ESCALIER

A. Expérience n°3C : Effet du SK&F-89976-A (4-16 mg/kg, i.p.) en solution dans le DMI à 25% (30 mn)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 32 rats mâles Wistar de 300-400 g (élevage du laboratoire).
- Traitements : Ils sont réalisés, par voie i.p., 30 mn avant le test :

* Lot contrôle : DMI à 25% (N = 8) ;

* Lots traités avec le SK&F-89976-A : 4 mg/kg (N = 8) ;
8 mg/kg (N = 8) ;
16 mg/kg (N = 8), en solution dans le DMI à 25%.

2. Résultats

L'analyse par le test de Kruskal-Wallis montre les résultats suivants (DDL = 3, N = 32) :

- ASC1 : H = 2.35 ; N.S.
- ASC2 : H = 4.11 ; N.S.
- ASC3 : H = 3.61 ; N.S.
- TOTASC : H = 6.00 ; N.S.
- DESC1 : H = 1.16 ; N.S.
- DESC2 : H = 4.74 ; N.S.
- DESC3 : H = 9.33 ; p = .0252
- DEF1 : H = 2.22 ; N.S.
- DEF2 : H = 2.67 ; N.S.
- DEF3 : H = 5.82 ; N.S.
- TOTDEF : H = 2.77 ; N.S.
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.36 ; N.S.
- TOIL3 : H = 2.82 ; N.S.

- TOTDESC : H = 8.06 ; p = .0447
- MARCHES TOT : H = 7.95 ; p = .047
- R+Rp1 : H = 5.83 ; N.S.
- R+R2 : H = 5.77 ; N.S.
- R+R3 : H = 1.97 ; N.S.
- TOTRR : H = 5.72 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 5.58 ; N.S.
- LAT M1 : H = 3.73 ; N.S.
- LAT M5 : H = 1.88 ; N.S.

Les seuls paramètres montrant une hétérogénéité entre les différents lots sont le nombre de marches descendues et le nombre total de marches montées ou descendues. Dans les lots traités avec le SK&F-89976-A, en dehors d'une diminution du nombre de marches descendues pendant la troisième mn du test, avec une dose de 16 mg/kg de poids corporel (Figure 78), aucune modification de comportement n'a pu être statistiquement démontrée, par rapport au lot contrôle (Tableau 51). Le nombre total de marches montées et descendues est significativement plus faible avec 16 mg/kg, par rapport aux 2 plus faibles doses (Tableau 51). La diminution de l'activité locomotrice évolue donc d'une manière dose-dépendante. Le nombre de marches montées et le nombre de redressements effectués ont tendance à diminuer avec la plus forte dose, mais de façon non significative (Figure 78). Il y a donc une petite baisse du niveau d'activité générale.

Avec 8 mg de SK&F-89976-A par kg, le nombre de marches montées ou descendues augmente légèrement, mais le nombre de redressements augmente également. Ainsi, nous pouvons dire qu'aucune des trois doses de SK&F-89976-A utilisées ne provoque d'effet de type anxiolytique (Figure 78). Plusieurs raisons sont envisageables pou expliquer cette absence d'effet anxiolytique : Soit le solvant masque l'effet de la substance (comme dans l'expérience.n°2B), soit les doses testées sont inférieures à la dose efficace, soit le SK&F-89976-A n'est pas encore ou plus actif, 30 mn après l'injection, soit il est totalement dépourvu d'activité anxiolytique. Afin de vérifier les deux premières hypothèses, le SK&F-89976-A a été testé en solution dans le NaCl 9‰ et à un dosage différent, dans l'expérience suivante.

B. Expérience n°4C : Effet du SK&F-89976-A (3-24 mg/kg, i.p.) en solution dans le NaCl 9‰ (30 mn)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 60 rats femelles Wistar de 250-300 g (élevage du laboratoire).

- Traitements : Ils sont réalisés, par voie i.p., 30 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;

TRAITEMENT	TEMOIN		SK&F 3 mg/kg		SK&F 6 mg/kg		SK&F 12 mg/kg		SK&F 24 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,4	0,6	3,5	0,7	2,4	0,6	1,6 *a	0,5	0,3 ***abc	0,2
ASC2	5,1	0,5	5,3	0,5	3,5 *	0,7	2,3 **a	0,5	0,4 ***abc	0,3
ASC3	5,0	0,9	4,8	0,7	4,1	0,9	1,9 *a	0,5	0,3 ***abc	0,2
TOTASC	13,5	1,4	13,7	1,6	10,0	1,6	5,8 ***a	0,9	1,0 ***abc	0,4
DESC1	0,6	0,2	1,6	0,6	0,4 a	0,3	0,2 a	0,1	0,0 *a	0,0
DESC2	5,3	0,9	4,3	1,1	3,1	0,8	1,7 **	0,5	0,0 ***abc	0,0
DESC3	5,5	0,7	5,3	0,6	4,8	0,7	3,0 *a	0,8	0,1 ***abc	0,1
TOTDESC	11,4	1,3	11,2	1,7	8,3	1,3	4,8 **a	1,0	0,1 ***abc	0,1
MARCHES TOT	24,9	2,7	24,8	3,2	18,3	2,9	10,7 **a	1,8	1,1 ***abc	0,5
R+Rp1	6,8	0,9	5,7	0,6	5,3	0,6	3,4 **ab	0,5	1,4 ***abc	0,4
R+Rp2	8,3	1,2	8,7	0,6	6,5	1,0	4,4 **ab	0,6	0,9 ***abc	0,4
R+Rp3	9,9	0,9	11,0	0,9	8,7	1,1	5,3 **ab	0,9	1,1 ***abc	0,4
TOTRR	25,1	2,3	25,3	1,0	20,4	2,3	13,1 ***ab	1,5	3,4 ***abc	1,0
DEF1	0,0	0,0	0,3	0,3	0,4	0,3	0,0	0,0	0,3	0,2
DEF2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF3	0,2	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0
TOTDEF	0,5	0,5	0,8	0,8	0,8	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
TOIL3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0
TOTTOIL	0,3	0,2	0,2	0,1	0,0	0,0	0,3	0,1	0,0	0,0
LAT M1	34,6	5,6	24,3	4,8	38,3	6,2	40,0 a	6,2	129,5 ***abc	18,3
LAT M5	69,3	9,2	77,8	9,8	96,9	11,9	134,4 **a	14,8	179,9 ***abc	0,1

Tableau 52: Expérience n°4C: Effets du SK&F-89976-A (3-24 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le NaCl 9‰, dans le test de l'escalier, chez le rat Wistar. *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot témoin; a: $p < .05$ par rapport à 3 mg/kg; b: $p < .05$ par rapport à 6 mg/kg; c: $p < .05$ par rapport à 12 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 12 par lot.

* Lots traités avec le SK&F-89976-A : 3 mg/kg (N = 12) ;
6 mg/kg (N = 12) ;
12 mg/kg (N = 12) ;
24 mg/kg (N = 12), en solution dans le NaCl 9‰.

2. Résultats

Etant donné que cette substance est soluble dans l'eau, nous avons renouvelé l'expérience en dissolvant le SK&F-89976-A dans du NaCl 9‰, ce qui nous permet de contourner le problème du véhicule d'injection. L'analyse par le test de Kruskal-Wallis montre les résultats suivants (DDL = 4, N = 60) :

- ASC1 : H = 20.13 ; p = .0005
- ASC2 : H = 32.63 ; p = .0001
- ASC3 : H = 29.07 ; p = .0001
- TOTASC : H = 37.50 ; p = .0001
- DESC1 : H = 15.43 ; p = .0039
- DESC2 : H = 23.87 ; p = .0001
- DESC3 : H = 29.71 ; p = .0001
- TOTDESC : H = 35.94 ; p = .0001
- MARCHES TOT : H = 37.08 ; p = .0001
- R+Rp1 : H = 30.12 ; p = .0001
- R+R2 : H = 33.73 ; p = .0001
- R+R3 : H = 36.33 ; p = .0001
- TOTRR : H = 40.22 ; p = .0001
- DEF1 : H = 4.19 ; N.S.
- DEF2 : H = 3.56 ; N.S.
- DEF3 : H = 2.07 ; N.S.
- TOTDEF : H = 4.14 ; N.S.
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.00 ; N.S.
- TOIL3 : H = 5.64 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 7.75 ; N.S.
- LAT M1 : H = 23.30 ; p = .0001
- LAT M5 : H = 31.33 ; p = .0001

En dehors des défécations et des toilettages, tous les paramètres pris en compte sont modifiés par le SK&F-89976-A (Tableau 52). Le nombre total de marches montées et le nombre total de marches descendues sont diminués par le SK&F-89976-A d'une manière dose-dépendante, cette diminution atteignant le niveau de significativité statistique à partir de 12 mg/kg. D'abord comparable aux témoins avec 3 mg de SK&F-89976-A par kg, il diminue à partir de 6 mg/kg pour devenir presque nul avec 24 mg/kg. Le nombre de redressements effectués évolue parallèlement au nombre de marches montées (Figure 79). Les latences de montée de la première et de la dernière marche augmentent d'une manière dose-dépendante avec le SK&F-89976-A, la différence avec le lot témoin devenant statistiquement significative à partir de 24 mg/kg pour la première et à partir de 12 mg/kg pour la dernière.

Ainsi, le SK&F-89976-A montre, dans cette expérience, des effets sédatifs dose-dépendants significatifs à partir de 12 mg/kg et aucune activité anxiolytique n'est observable (Figure 79). Il faut noter que nous n'avons pas rajouté de lot traité

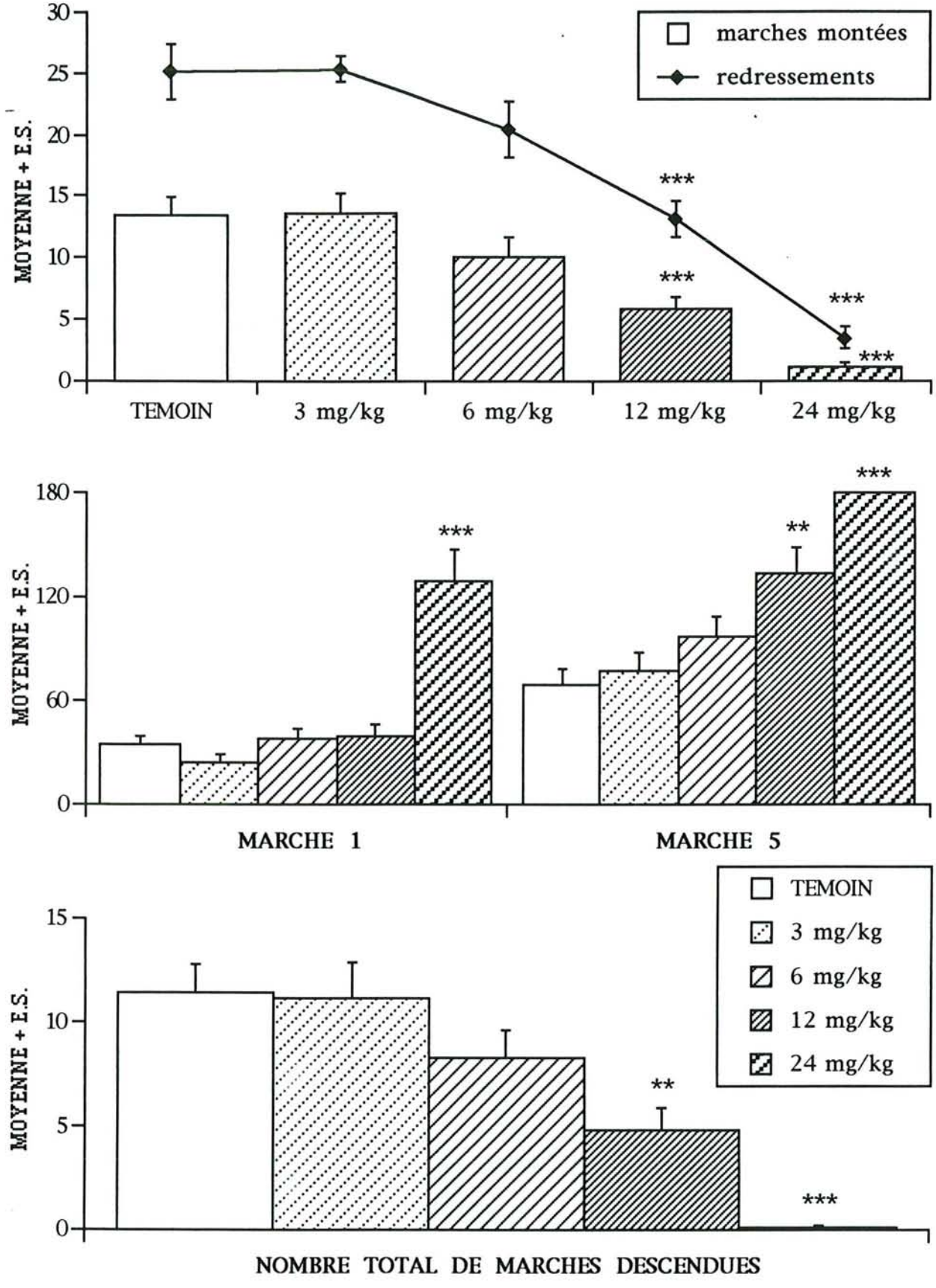


Figure 79: Expérience n°4C: Effet du SK&F-89976-A (3-24 mg/kg, i.p. 30 mn avant le test) en solution dans le NaCl 9‰ sur le nombre de marches montées et de redressements effectués (haut), la latence de montée de la première et de la dernière marche (milieu) et le nombre total de marches descendues pendant le test (bas), chez le rat Wistar. **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot témoin (test de Mann-Whitney).

avec le DZP dans cette expérience, celui-ci n'étant pas soluble dans le NaCl 9‰. En résumé, le SK&F-89976-A montre des effets sédatifs dose-dépendants mais semble dépourvu d'effets anxiolytiques. Ces effets sédatifs ne sont pas aussi importants que ceux du DZP, puisqu'on ne les distingue pas à l'observation du comportement général des rats, mais uniquement dans les résultats du test de l'escalier.

Il semble donc que l'absence d'effets de type anxiolytique dans l'expérience n°3C n'était liée ni au véhicule d'injection, ni à un intervalle trop court entre l'administration et le test.

C. Discussion

Heit & Schwark (1988) ont observé des effets secondaires (sédation, relâchement des muscles abdominaux, écartement des pattes postérieures et ataxie) après une administration orale de 30 mg de SK&F-89976-A par kg, mais aucun effet secondaire n'était distingué avec 15 mg/kg. Löscher & Schwark (1985) par contre, n'ont pas observé d'effets secondaires lorsque le SK&F-89976-A était injecté en i.p. 30 mn avant l'expérimentation, aux doses de 5, 10 et 20 mg/kg, dosage comparable à celui employé dans nos expériences. Les paramètres pris en compte étaient la locomotion spontanée, les réflexes de redressements quand le rat est soulevé par la queue, la lacrimation, etc..., c'est-à-dire une observation de l'état général du rat effectuée tout de suite après l'injection. Or, le test de l'escalier permet une analyse plus fine de l'état d'activité du rat. De plus, immédiatement après l'administration, le SK&F-89976-A n'a pas encore diffusé dans l'organisme et ses effets sur l'activité générale ne sont peut-être pas encore observables. C'est ce qui explique probablement la différence avec nos résultats.

Dans l'expérience n°3C, on pouvait penser que comme dans le cas du DZP, c'est-à-dire en raison de la présence d'effets secondaires liés au DMI, aucun effet anxiolytique ne pouvait être montré avec le SK&F-89976-A chez le rat Wistar, lorsque le DMI était utilisé comme véhicule. Cependant, au vu des résultats de l'expérience n°4C, il apparaît que les effets secondaires observés dans la première expérience n'étaient liés ni au véhicule d'injection seul, ni à un intervalle trop court entre l'administration et le test, mais au SK&F-89976-A lui-même. Par conséquent, le SK&F-89976-A montre, dans le test de l'escalier, des effets sédatifs dose-dépendants mais ne montre aucune activité de type anxiolytique.

Le SK&F-89976-A montre un profil d'activité différent de celui du DZP. Comme le DZP, il présente des propriétés anticonvulsivantes vis-à-vis du PTZ, mais à des doses supérieures au DZP. Par contre, contrairement au DZP, il n'a montré aucun effet de type anxiolytique dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson et dans le test de l'escalier, où il a montré des effets secondaires. Les effets secondaires du SK&F-89976-A sont cependant moins marqués que ceux du DZP et

apparaissent à des doses nettement supérieures. L'ensemble de ces données suggère que l'augmentation centrale de l'activité GABAergique produise une activité anticonvulsivante mais ne modifie pas le niveau d'anxiété des animaux, contrairement aux BZD qui possèdent les 2 activités. L'augmentation du taux cérébral de GABA synaptique, induite par le SK&F-89976-A, est peut-être insuffisante ou inadéquate pour produire une activité anxiolytique. Au lieu d'augmenter l'activité GABAergique cérébrale en inhibant la recapture du GABA, il est possible d'agir d'une manière différente, notamment en apportant du GABA exogène. Nous avons vu que le GABA ne traversait pratiquement pas la BHE et que les injections cérébrales présentaient un certain nombre d'inconvénients. L'utilisation de systèmes de libération chimique pour augmenter le taux de GABA central semble donc un moyen intéressant, n'ayant pas les inconvénients des administrations cérébrales, pour produire une augmentation de la quantité de GABA disponible dans tout le SNCtout en limitant les concentrations périphériques à des niveaux faibles. Le chapitre suivant est consacré à l'étude comportementale de différents SLC transportant du GABA ou de l'acide nipécotique.

CHAPITRE 7

PROPRIETES ANXIOLYTIQUES DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE APPLIQUES AU GABA ET A L'ACIDE NIPECOTIQUE

I. TEST DE L'ESCALIER

Nous avons évalué les effets de plusieurs SLC et nous les avons comparés aux effets du DZP. Afin de vérifier que les conditions expérimentales journalières permettaient la mise en évidence d'un effet anxiolytique, un lot traité avec 0.8 mg de DZP par kg de poids corporel (dans le même véhicule) était réalisé dans chaque expérience. Un lot témoin (NaCl 9‰) et un lot contrôle (Transcutol 30%, Tween 10%) étaient également réalisés dans chaque expérience, afin de détecter les éventuels effets du véhicule.

Les SLC qui ont été étudiés sont les suivants :

- le SLC14, composé d'un transporteur de type dihydrotrigonelline et d'une molécule de GABA protégée par un noyau benzyl ;

- le SLC13, composé d'un transporteur de type mixte et d'une molécule de GABA ;
- le SLC19, composé d'un transporteur de type mixte et d'une molécule de GABA protégée par un noyau benzyl ;
- le SLC18, composé d'un transporteur de type mixte et d'une molécule de nipécotate ;

- le SLC17, composé d'un transporteur de type quinoléine et d'une molécule de GABA ;
- le SLC15, composé d'un transporteur de type quinoléine et d'une molécule de nipécotate.

A. Expérience n°1D : Effets du SLC13 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 49 rats mâles Wistar de 150-180 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :

* Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 10) ;

* Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 7) ;

* Lots traités avec le SLC13 : 5 mg/kg (N = 8) ;
10 mg/kg (N = 8) ;
20 mg/kg (N = 9), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC13 5 mg/kg		SLC13 10 mg/kg		SLC13 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	1,7	0,4	2,0	1,0	0,4	0,2	2,0	1,0	0,7	0,7	2,1	0,9
ASC2	2,9	0,6	2,4	0,8	2,3	0,5	3,9	0,8	1,3	0,9	3,4	0,9
ASC3	6,0	0,9	3,3	0,6	3,5	0,8	4,3	1,0	2,7	2,2	2,1	0,9
TOTASC	10,6	1,4	7,7	1,7	6,1	1,3	10,1	2,3	4,7	3,7	7,7	2,0
DESC1	0,6	0,3	0,9	0,4	0,3	0,2	1,7	0,9	0,0	0,0	1,6	0,9
DESC2	2,6	0,5	2,1	0,8	0,8	0,4	2,9	0,7	1,7	1,7	2,0	0,9
DESC3	3,2	0,8	3,3	0,7	3,8	0,8	3,9	0,9	1,0	0,6	2,3	0,7
TOTDESC	6,4	1,3	6,3	1,5	4,8	1,0	8,4	1,9	2,7	2,2	5,9	1,3
MARCHES TOT	17,0	2,6	14,0	3,2	10,9	2,2	18,6	4,2	7,3	5,9	13,6	3,3
R+Rp1	6,4	1,1	5,6	0,9	4,6	1,4	4,1	0,8	6,0	2,9	4,4	1,2
R+Rp2	5,8	0,7	7,3	0,8	4,3 *	0,6	8,3 °ab	1,0	5,0	1,2	3,9	1,1
R+Rp3	8,9	1,1	9,4	1,1	5,3 °*	0,9	8,9 ab	1,0	2,7 °*b	0,9	3,1 °°**	1,2
TOTRR	21,1	2,2	22,3	2,3	14,1 °*	2,2	21,3 ab	1,9	13,7	4,1	11,4 °*	2,6
DEF1	0,6	0,3	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	1,3	0,7	0,9	0,6
DEF2	0,4	0,3	1,4	0,7	1,0	0,5	0,6	0,4	1,7	1,2	0,4	0,3
DEF3	0,2	0,2	1,4 °	0,4	0,3 *	0,3	1,4 °	0,6	0,0	0,0	0,3 *	0,2
TOTDEF	1,2	0,7	3,1	1,0	1,4	0,6	2,1	1,0	3,0	1,7	1,6	1,0
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,8	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2
TOIL3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4	0,3	0,7	0,3	0,1	0,1
TOTTOIL	0,4	0,2	0,6	0,2	1,1	0,4	0,4	0,3	0,7	0,3	0,4	0,2
LAT M1	45,1	8,3	47,3	16,8	72,4	15,0	29,7	10,3	113,0	36,4	61,1	24,7
LAT M5	131,5	13,5	130,0	22,6	163,1	9,1	139,6	23,5	145,3	34,7	113,4	29,0

Tableau 53: Expérience n°1D: Effets du SLC13 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 7 à 10 par lot.

* Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 7), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Le SLC 13 comporte un transporteur de type mixte auquel est fixée une molécule de GABA. Parmi les doses testées, certaines ont montré des effets toxiques. En effet, des décès sont survenus avec les 2 doses les plus élevées, très peu de temps après l'injection de la solution :

- 0 mort sur 8 rats avec 5 mg/kg ;
- 1 mort sur 8 rats avec 10 mg/kg, 10 mn après l'administration ;
- 6 morts sur 9 rats avec 20 mg/kg, moins de 2 mn après l'administration.

Les données de cette expérience nous ont permis de calculer une dose létale 50 du SLC 13 : DL_{50} = 16.7 mg/kg ± 2.6 (méthode de Berkson, 1953). L'observation des animaux montre un épanchement de synovie au niveau des narines, au moment du décès, suggérant la survenue d'un choc osmotique sanguin.

L'effectif total passe donc de 49 à 42 pour les données comportementales. L'analyse des résultats présentés dans le Tableau 53 par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 42) :

- ASC1 : H = 6.48 ; N.S.
- ASC2 : H = 4.31 ; N.S.
- ASC3 : H = 9.70 ; N.S.
- TOTASC : H = 5.96 ; N.S.
- DESC1 : H = 8.08 ; N.S.
- DESC2 : H = 7.27 ; N.S.
- DESC3 : H = 5.47 ; N.S.
- TOTDESC : H = 4.79 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 5.03 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 4.01 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 12.95 ; p = .0239
- R+Rp3 : H = 19.59 ; p = .0015
- TOTRR : H = 14.26 ; p = .014
- DEF1 : H = 5.72 ; N.S.
- DEF2 : H = 4.15 ; N.S.
- DEF3 : H = 12.70 ; p = .0264
- TOTDEF : H = 3.91 ; N.S.
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 9.50 ; N.S.
- TOIL3 : H = 2.97 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 5.09 ; N.S.
- LAT M1 : H = 7.63 ; N.S.
- LAT M5 : H = 3.67 ; N.S.

Seuls les redressements et les défécations présentent une hétérogénétité statistiquement significative entre les lots. Entre le lot témoin et le lot contrôle, la seule différence significative du point de vue statistique détectée, se situe au niveau du nombre de défécations pendant la troisième mn du test, qui est supérieur dans le lot contrôle par rapport au lot témoin (Tableau 53). On peut donc considérer que, dans

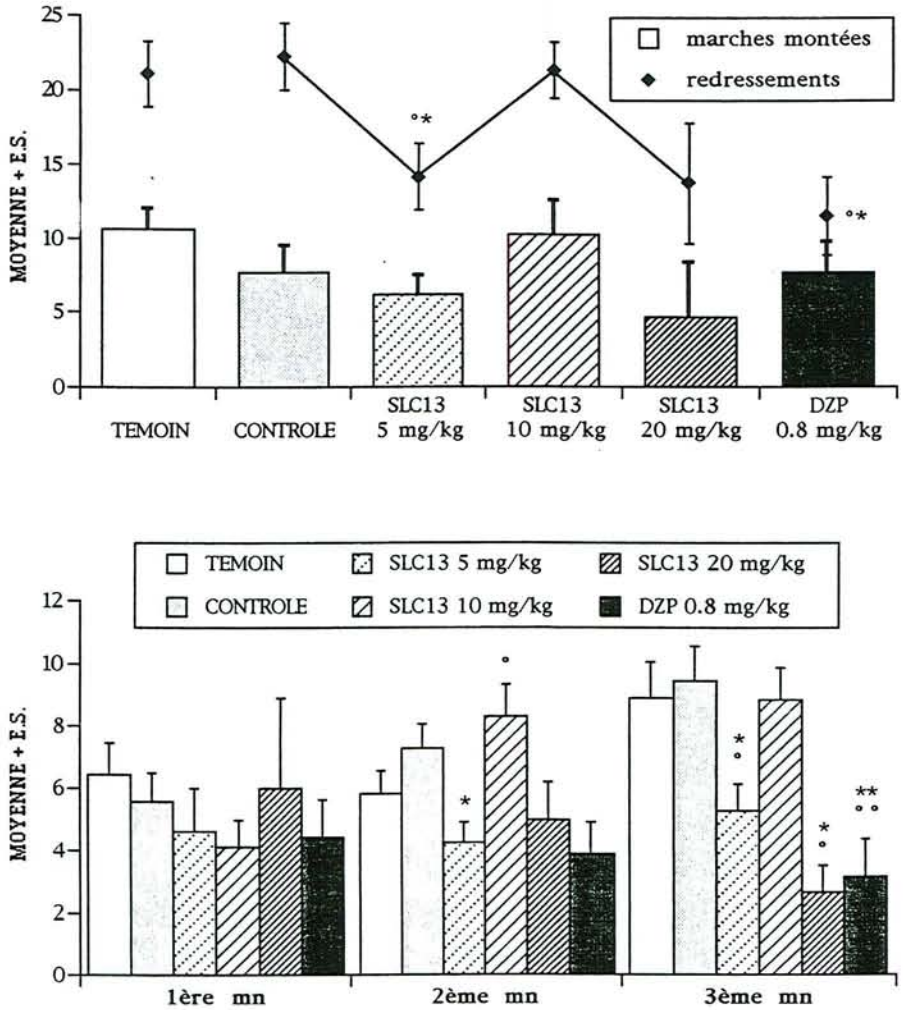


Figure 80: Expérience n°1D: Effets du SLC13 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur le nombre de redressements effectués minute par minute (bas). °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

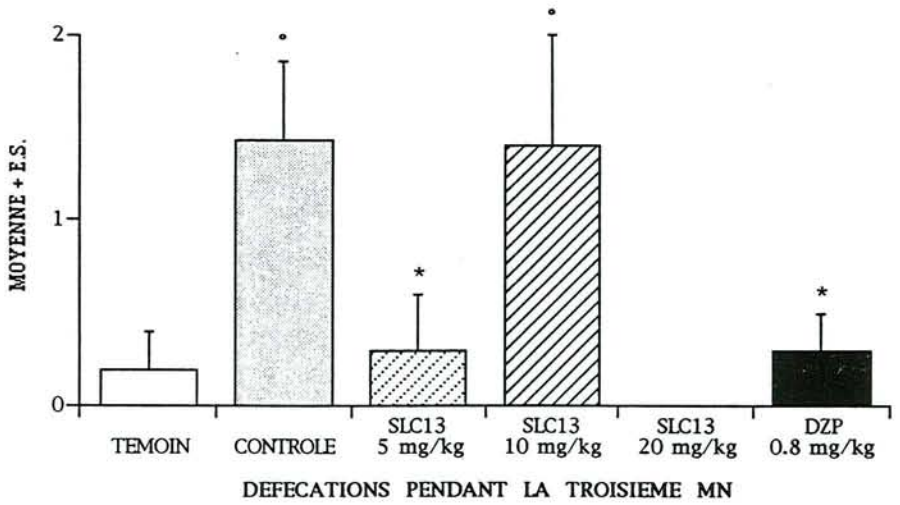


Figure 81: Expérience n°1D: Effets du SLC13 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience, sur le nombre de défécations effectuées pendant la troisième mn du test. °: $p < .05$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

cette expérience, le véhicule est pratiquement dépourvu d'effets propres sur les paramètres pris en compte, pouvant interférer avec les effets du SLC13 et du DZP.

Le lot traité avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg montre un effet de type anxiolytique caractérisé par une diminution du nombre de redressements, significative par rapport aux lots témoin et contrôle, sans modification statistiquement significative du nombre de marches montées (Figure 80). Le DZP provoque également une augmentation du nombre de défécations pendant la troisième mn du test (Figure 81).

A la dose de 5 mg/kg, le SLC13 induit une diminution statistiquement significative du nombre total de redressements par rapport aux lots témoin et contrôle (Figure 80) et une diminution du nombre de défécations pendant la troisième mn du test par rapport au lot contrôle (Figure 81), les autres paramètres observés n'étant pas modifiés d'une manière significative (Tableau 53). Donc, il s'agit d'un profil de type anxiolytique. Par contre, avec 10 et 20 mg/kg, aucune différence significative du point de vue statistique n'a été obtenue par rapport au lot contrôle, mise à part une diminution du nombre de redressements effectués pendant la troisième mn du test avec la plus forte dose. Ainsi, les effets de type anxiolytique observés à la plus faible dose testée disparaissent avec l'augmentation de la dose et n'évoluent pas d'une manière dose-dépendante (Figure 80). Le nombre total de redressements effectués par les rats traités avec 10 mg de SLC13 par kg est statistiquement différent de celui des rats traités avec 5 mg/kg. Par contre, avec 20 mg/kg, ce paramètre retrouve une valeur comparable à celle observée avec 5 mg/kg, qui n'est cependant statistiquement différente du contrôle que pendant la troisième mn du test (Figure 80).

En comparant les 3 lots traités avec le SLC13 au lot traité avec le DZP, on constate que la seule dose de SLC13 ne montrant pas de différences significatives avec le DZP est la plus faible dose testée (Tableau 53). Le SLC13, à la dose de 5 mg/kg, provoque donc des effets comparables à ceux du DZP, à la dose de 0.8 mg/kg dans le test de l'escalier.

Cette expérience a montré que le véhicule n'interférait pas avec les effets des substances testées et que, au vu des résultats observés avec le DZP, les conditions de l'expérience permettaient la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique. Le SLC 13 a montré des effets comparables à ceux du DZP et semble donc avoir une activité de type anxiolytique à la dose de 5 mg/kg. Par conséquent, il serait intéressant de tester un dosage inférieur à 5 mg/kg, plus éloigné des doses toxiques.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC14 5 mg/kg		SLC14 10 mg/kg		SLC14 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	2,6	0,9	3,0	0,5	0,8 **a	0,4	1,4 *a	0,7	2,3	0,7	3,4	0,5
ASC2	3,0	0,8	5,2	0,5	3,8	1,1	2,9	0,9	4,1	0,9	5,1	0,6
ASC3	4,8	1,1	5,1	0,7	4,3	1,3	5,5	1,2	5,3	0,8	4,3	0,9
TOTASC	10,4	2,6	13,3	1,2	8,8	2,5	9,8	2,4	11,8	1,4	12,8	1,5
DESC1	1,2	0,4	0,7	0,3	0,8	0,4	0,6	0,2	1,1	0,8	2,0	0,5
DESC2	2,8	1,1	3,8	0,5	2,8	1,2	2,5	1,0	3,7	0,8	4,7	0,7
DESC3	4,9	1,3	6,0	0,7	3,5	0,9	4,6	1,1	3,9	0,7	3,9	1,0
TOTDESC	8,9	2,5	10,5	1,0	7,0	2,2	7,7	2,1	8,7	1,6	10,6	1,7
MARCHES TOT	19,3	5,1	23,8	2,2	15,8	4,7	17,5	4,4	20,4	3,0	23,4	3,1
R+Rp1	4,5	1,3	6,6	0,6	4,8	1,1	7,0	0,9	5,8	1,2	6,2	0,9
R+Rp2	9,6	1,5	7,9	1,0	6,6	0,8	7,2	1,0	6,8	1,2	7,8	0,8
R+Rp3	9,0	1,3	9,7	1,1	7,8	1,5	8,9	1,0	9,7	1,9	7,5	1,2
TOTRR	23,1	3,7	24,2	2,0	19,1	2,8	23,1	1,7	22,2	3,0	21,5	2,0
DEF1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,4	0,2
DEF2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,1	0,1	1,1	0,6	0,6	0,3	1,1	0,5
DEF3	0,7	0,7	0,5	0,4	1,0	0,6	0,6	0,4	0,3	0,2	0,6	0,3
TOTDEF	0,9	0,7	0,8	0,7	1,1	0,7	1,7	0,9	1,0	0,7	2,1	0,7
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,5	0,2	0,4	0,2	0,6	0,2	0,1	0,1
TOIL3	0,4	0,2	0,7	0,1	0,4	0,2	0,6	0,3	0,1	0,1	0,6	0,2
TOTTOIL	0,5	0,2	0,8	0,2	1,0	0,3	1,3	0,4	0,7	0,2	0,7	0,3
LAT M1	55,2	19,0	35,2	7,0	63,9	12,2	72,8	18,8	36,2	6,8	22,0	4,3
LAT M5	121,0	19,9	100,3	12,1	151,8	16,0	137,6	15,4	110,4	19,1	103,1	15,3

Tableau 54: Expérience n°2D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience. *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .01$ par rapport au DZP 0.8 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 8 à 12 par lot.

B. Expérience n°2D : Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 59 rats mâles Wistar de 140-180 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 10) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;
  * Lots traités avec le SLC14 : 5 mg/kg (N = 8) ;
    10 mg/kg (N = 10) ;
    20 mg/kg (N = 9), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Le SLC 14 est composé d'un transporteur de type dihydrotrigonelline auquel est fixée une molécule de GABA portant un noyau benzyl. Aucun effet toxique n'a été observé aux doses testées.

Le Tableau 54 présente les résultats recueillis dans cette expérience. L'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 59) :

- ASC1 : H = 14.36 ; p = .0135
- ASC2 : H = 7.76 ; N.S.
- ASC3 : H = 1.48 ; N.S.
- TOTASC : H = 4.61 ; N.S.
- DESC1 : H = 9.07 ; N.S.
- DESC2 : H = 6.96 ; N.S.
- DESC3 : H = 4.06 ; N.S.
- TOTDESC : H = 4.64 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 4.55 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 4.82 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 3.55 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 1.97 ; N.S.
- TOTRR : H = 2.10 ; N.S.
- DEF1 : H = 8.67 ; N.S.
- DEF2 : H = 7.31 ; N.S.
- DEF3 : H = 2.00 ; N.S.
- TOTDEF : H = 4.66 ; N.S.
- TOIL1 : H = 7.64 ; N.S.
- TOIL2 : H = 8.00 ; N.S.
- TOIL3 : H = 6.27 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 4.60 ; N.S.
- LAT M1 : H = 10.87 ; N.S.
- LAT M5 : H = 7.08 ; N.S.

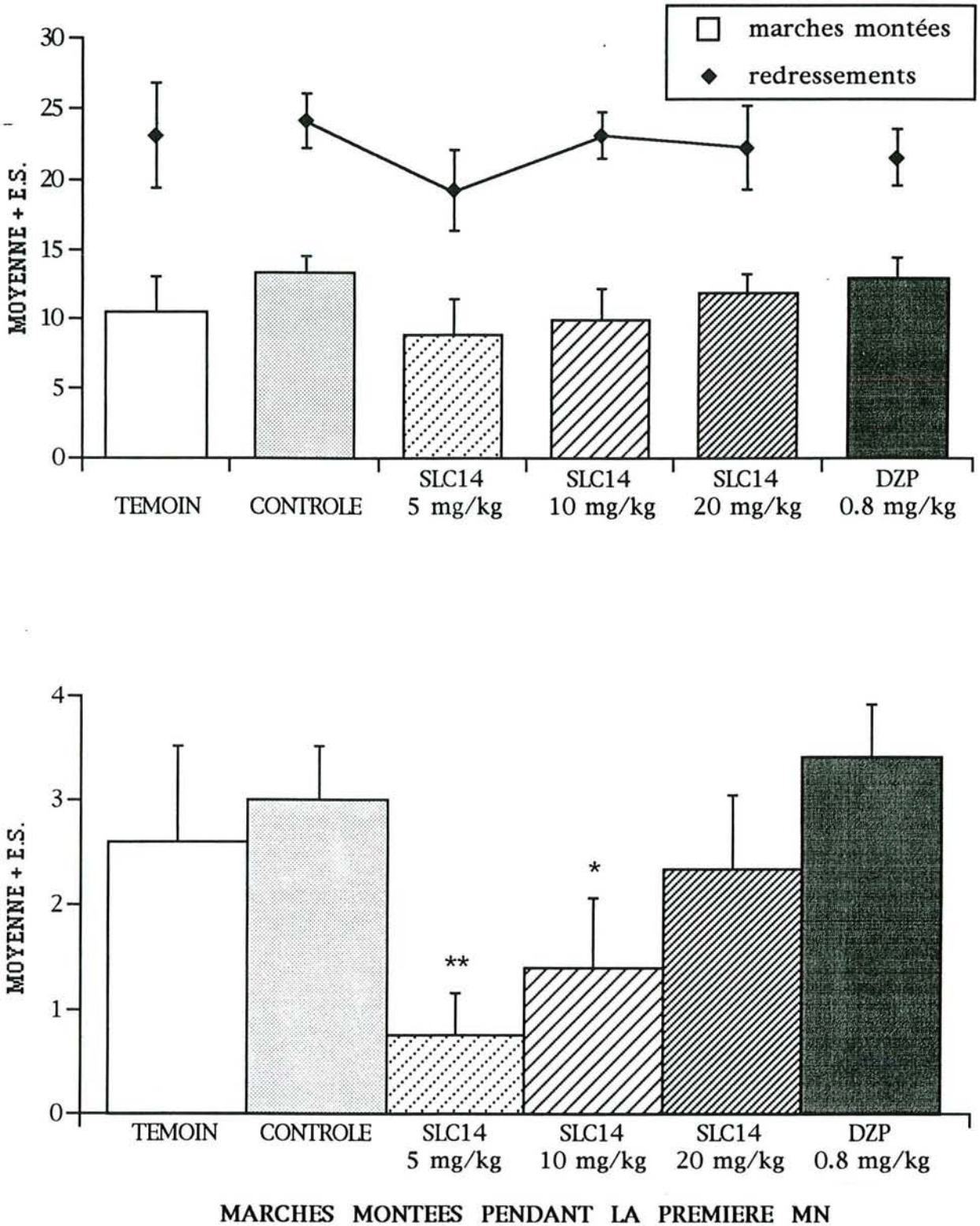


Figure 82: Expérience n°2D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur le nombre de marches montées pendant la première mn du test (bas). *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

Sur l'ensemble des lots, la seule différence statistiquement significative se situe pendant la première mn du test et concerne le nombre de marches montées. Entre le lot témoin et le lot contrôle, aucune différence significative du point de vue statistique n'est relevée (Tableau 54).

Dans les lots traités avec le SLC14, la seule différence qui apparaisse dans l'analyse statistique, par rapport au lot contrôle, est une diminution du nombre de marches montées, significative aux 2 plus faibles doses et pendant la première mn du test uniquement (Figure 82). Dans le lot traité avec 20 mg/kg, le niveau d'activité locomotrice retourne au niveau des contrôles. On observe, par ailleurs, une augmentation non significative de la latence de montée de la première marche dans les lots traités avec 5 ou 10 mg de SLC 14 par kg. Le nombre de redressements effectués, par contre n'est affecté par aucun des traitements (Figure 82).

Le DZP, à la dose de 0.8 mg/kg, n'induit aucune modification significative du point de vue statistique par rapport aux lots témoin et contrôle (Tableau 54). Contrairement aux résultats observés dans l'expérience précédente qui employait les mêmes conditions expérimentales, on observe toujours une diminution du nombre de redressements, mais qui n'est plus significative. Par conséquent, les conditions de l'expérience présente ne permettaient pas de mettre en évidence un effet anxiolytique significatif des traitements aux doses employées. Cette expérience confirme donc les constatations effectuées dans le chapitre concernant le DZP, c'est-à-dire que les effets du DZP ne sont pas reproductibles avec des rats n'ayant bénéficié que d'une semaine d'habituation aux conditions du laboratoire. La comparaison DZP/SLC14 montre que les rats traités avec 5 ou 10 mg de SLC14 par kg montent moins de marches que les lots traités avec le DZP pendant la première mn du test, mais que l'activité comportementale des rats traités avec 20 mg de SLC14 par kg ne diffère pas significativement de celle des rats traités avec le DZP.

En résumé, le véhicule d'injection, comme dans l'expérience précédente, n'affecte pas significativement les paramètres pris en compte. Toutefois, les conditions expérimentales journalières ne permettaient pas la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Le SLC 14 provoque une diminution de l'activité locomotrice au début du test avec 5 et 10 mg/kg. Par contre, il montre un profil comportemental comparable à celui du DZP à la dose de 20 mg/kg. Toutefois, ces résultats restent à vérifier, étant donné l'absence d'effet significatif du DZP. Cette expérience sera donc reproduite avec des rats ayant séjourné au laboratoire pendant 2 semaines avant l'expérience (expérience n°5D).

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC15 5 mg/kg		SLC15 10 mg/kg		SLC15 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	1,6	0,6	2,3	0,6	2,9	0,8	3,7	1,0	2,9	1,0	3,6	0,7
ASC2	4,3	0,7	3,7	0,9	3,7	1,0	3,6	0,7	3,8	0,8	4,3	0,9
ASC3	5,1	0,9	2,9	0,7	4,5	0,8	5,0	1,0	4,3	0,8	5,2	1,1
TOTASC	11,0	1,6	8,9	0,9	11,1	1,8	12,2	2,1	11,0	1,8	13,1	2,0
DESC1	0,8	0,2	1,3	0,4	1,3	0,5	2,3	0,7	1,6	0,6	2,2	0,6
DESC2	3,9	0,7	1,5	0,6	3,1	0,8	4,3	0,9	2,7	0,7	3,6	0,8
DESC3	4,2	0,8	4,2	0,6	5,1	1,1	3,8	0,7	4,1	1,2	5,3	1,2
TOTDESC	8,9	1,3	7,0	1,1	9,5	2,1	10,4	1,8	8,3	2,1	11,1	2,1
MARCHES TOT	19,9	2,8	15,9	2,0	20,6	3,8	22,7	3,8	19,3	3,9	24,2	4,0
R+Rp1	6,9	1,1	5,6	0,6	5,5	0,6	6,2	0,8	5,4	0,5	5,2	0,7
R+Rp2	7,5	0,9	5,8	0,9	7,8	1,3	9,9	1,2	7,1	0,9	7,3	0,6
R+Rp3	10,1	1,6	8,3	1,6	8,8	1,5	8,7	1,5	6,7	1,1	6,4	1,3
TOTRR	24,5	3,2	19,7	2,5	22,1	3,0	24,8	2,8	19,2	1,8	18,9	2,0
DEF1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF2	0,4	0,3	0,6	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	1,2	0,8
DEF3	0,5	0,3	0,8	0,6	0,3	0,3	0,4	0,3	0,9	0,6	0,2	0,1
TOTDEF	0,9	0,6	1,5	0,6	0,3	0,3	0,4	0,3	1,1	0,8	1,4	0,8
TOIL1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
TOIL2	0,4	0,2	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,0	0,0
TOIL3	0,6	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2	0,6	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2
TOTTOIL	1,1	0,3	0,5	0,3	0,7	0,3	0,8	0,3	0,7	0,2	0,5	0,2
LAT M1	38,2	7,8	30,7	5,9	40,1	11,3	24,6	4,8	30,0	9,5	16,4	2,8
LAT M5	141,9	16,3	93,8	17,2	115,0	20,6	119,8	22,0	98,3	21,5	96,6	18,8

Tableau 55: Expérience n°3D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience. N = 9 à 10 par lot.

C. Expérience n°3D : Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (1 semaine d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 58 rats mâles Wistar de 130-170 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 10) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 10) ;
  * Lots traités avec le SLC15 : 5 mg/kg (N = 10) ;
    10 mg/kg (N = 9) ;
    20 mg/kg (N = 9), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Le SLC 15 contient un transporteur de type quinoléine rattaché à une molécule de nipécotate. Aucune effet toxique n'est apparu aux doses testées.

Les résultats recueillis dans cette expérience sont reportés dans le Tableau 55. L'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 58) :

- ASC1 : H = 6.06 ; N.S.
- ASC2 : H = 1.05 ; N.S.
- ASC3 : H = 4.83 ; N.S.
- TOTASC : H = 3.06 ; N.S.
- DESC1 : H = 5.11 ; N.S.
- DESC2 : H = 8.42 ; N.S.
- DESC3 : H = 2.25 ; N.S.
- TOTDESC : H = 3.61 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 3.00 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 2.14 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 7.20 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 4.26 ; N.S.
- TOTRR : H = 4.54 ; N.S.
- DEF1 : H = 4.80 ; N.S.
- DEF2 : H = 6.01 ; N.S.
- DEF3 : H = 1.53 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.08 ; N.S.
- TOIL1 : H = 2.90 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.68 ; N.S.
- TOIL3 : H = 7.16 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 3.45 ; N.S.
- LAT M1 : H = 5.46 ; N.S.
- LAT M5 : H = 4.77 ; N.S.

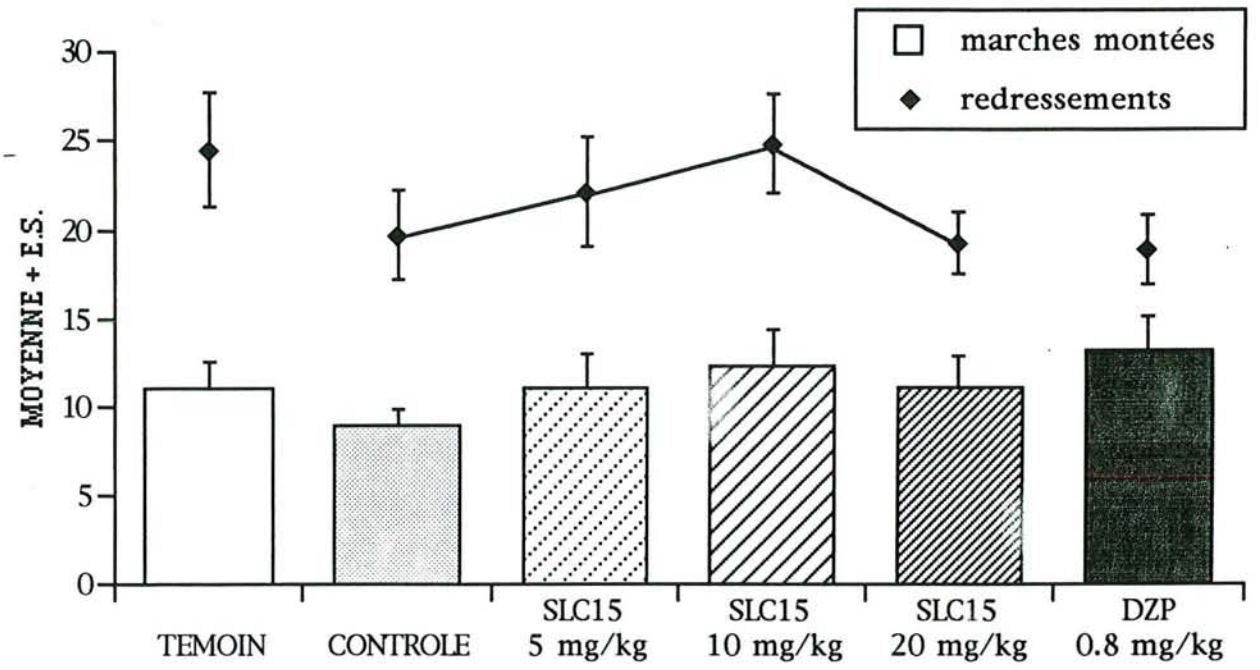


Figure 83: Expérience n°3D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 1 semaine avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués.

Dans cette expérience, aucun des paramètres pris en compte n'est affecté d'une manière statistiquement significative par les différents traitements. Entre le lot témoin et le lot contrôle, il n'y a aucune différence significative du point de vue statistique (Tableau 55).

De même, aucune différence statistiquement significative n'est détectable entre, d'une part, le lot contrôle et, d'autre part, les lots traités avec le SLC 15 ou le DZP. Le SLC15 produit une augmentation parallèle du nombre de marches montées et du nombre de redressements effectués avec 5 et 10 mg/kg, puis un retour au niveau des contrôles avec 20 mg/kg, mais ces différences n'atteignent pas le seuil de significativité statistique (Figure 83).

Le DZP a tendance d'une part à diminuer le nombre de redressements effectués et la latence de montée de la première marche, et d'autre part, à augmenter le nombre de marches montées, mais là encore, les modifications sont non significatives du point de vue statistique.

Comme dans l'expérience précédente et contrairement à l'expérience n°1D, les conditions expérimentales journalières ne permettaient pas la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec le DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Le SLC15 ne montre pas d'effet de type anxiolytique, mais ce résultat reste à vérifier, étant donné l'absence d'effet du DZP. En raison de la disparité des résultats observée avec le DZP et d'après les observations effectuées dans le chapitre concernant le DZP, c'est-à-dire une meilleure reproductibilité des résultats avec des rats habitués plus longtemps aux conditions du laboratoire, les expériences n°1D à 3D ont été reproduites avec des rats ayant séjourné pendant 2 semaines dans la salle d'expérimentation avant le test, au lieu d'1 semaine. Les résultats de ces nouvelles expériences sont présentés ci-dessous.

D. Expérience n°4D : Effets du SLC13 (2.5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 76 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 11) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC13 2.5 mg/kg		SLC13 5 mg/kg		SLC13 10 mg/kg		SLC13 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	2,5	0,6	3,4	0,4	2,8	0,6	2,7	0,6	3,1	0,6	0,0	0,0	2,2	0,6
ASC2	5,0	0,5	5,4	1,0	5,5	0,4	3,4	0,8	3,5	0,6	2,5	2,5	3,3	0,7
ASC3	5,5	0,9	5,8	1,0	5,3	0,5	6,2	1,2	4,8	0,8	0,5	0,5	4,3	1,1
TOTASC	13,0	1,5	14,6	2,0	13,6	1,1	12,3	1,9	11,5	1,1	3,0	3,0	9,8	1,9
DESC1	1,1	0,3	1,8	0,4	1,2	0,4	0,7	0,3	1,4	0,4	0,0	0,0	1,7	0,4
DESC2	3,7	1,0	5,1	0,8	4,5 a	0,7	4,0	0,8	3,5	0,6	0,0 °*bd	0,0	2,0 *	0,7
DESC3	5,9	0,7	5,4	0,8	5,8	0,7	5,3	1,2	4,4	0,7	0,5	0,5	4,5	1,1
TOTDESC	10,7	1,5	12,3	1,8	11,5	1,2	10,0	1,6	9,3	1,0	0,5	0,5	8,2	2,0
MARCHES TOT	23,7	2,9	26,8	3,8	25,1	2,2	22,3	3,5	20,7	2,0	3,5	3,5	18,0	3,8
RED1	1,9	0,5	2,2	0,5	1,2	0,3	1,0	0,5	2,0	0,4	0,0	0,0	1,6	0,6
RED2	3,5	0,7	5,3	0,9	4,7	0,7	3,2	0,6	3,2	0,6	0,5	0,5	3,1	0,9
RED3	4,5	0,8	5,9	0,3	4,9	0,6	6,0	1,2	4,2	0,6	2,5	2,5	3,0	0,6
TOTRED	9,9	1,4	13,4	1,5	10,8	0,9	10,2	1,2	9,4 *	1,0	3,0 *b	3,0	7,7 *	1,2
Rp1	4,9	0,6	7,0	0,8	5,7	0,4	7,1 °a	0,6	6,2	0,6	2,5	2,5	4,7 *	0,6
Rp2	5,8	0,5	5,8	0,7	5,3	0,4	4,8	0,8	5,2	0,8	3,0	3,0	3,7	0,6
Rp3	5,9	0,7	5,7	0,5	5,1	0,6	5,3	0,6	5,9	0,8	1,0	1,0	3,7	0,7
TOTRp	16,6	1,3	18,5	1,5	16,1 a	0,6	17,2 a	1,0	17,3 a	1,4	6,5 bc	6,5	12,1 °**	1,1
R+Rp1	6,8	0,9	9,2 °	0,7	6,8 *	0,4	8,1 a	0,5	8,2 a	0,6	2,5 *bcd	2,5	6,3 **	0,5
R+Rp2	9,4	0,6	11,2	0,8	10,0 a	0,9	8,0 *	0,9	8,4 *	1,0	3,5 °*	3,5	6,8 **	1,1
R+Rp3	10,4	0,7	11,6	0,7	10,0 a	0,7	11,3 a	1,3	10,1 a	1,0	3,5 °*	3,5	6,7 °**	1,1
TOTRR	26,5	1,4	31,9 °	1,5	26,8 *a	1,0	27,4 *a	1,1	26,6 *a	1,7	9,5 °*bc	9,5	19,8 °***	2,0
DEF1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,0 a	0,0	0,0 a	0,0	0,2	0,2	0,5 bc	0,5	0,8	0,4
DEF2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,7	0,4	0,0	0,0	1,2	0,6	0,0	0,0	1,3	0,6
DEF3	0,4	0,2	0,7	0,3	0,5	0,3	1,4	0,5	0,1	0,1	0,0	0,0	0,5	0,2
TOTDEF	0,5	0,3	0,9	0,4	1,2	0,6	1,4	0,5	1,5	0,7	0,5	0,5	2,6	1,0
TOIL1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,4	0,2	0,6	0,3	0,0	0,0	0,4	0,2	0,4	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1
TOIL3	0,4	0,3	0,8	0,3	0,5	0,2	0,2	0,1	0,5	0,2	0,5	0,5	0,3	0,2
TOTTOIL	0,8	0,4	1,4	0,3	0,5	0,2	0,7	0,2	0,8	0,2	0,5	0,5	0,4	0,2
LAT M1	32,6	6,5	34,3	13,7	35,5	5,3	55,1	16,2	28,0	4,9	120,5	59,5	30,6	10,8
LAT M5	112,7	14,9	90,4	14,0	101,6	9,9	118,6	15,5	113,1	17,8	143,0	37,0	138,7	16,4

Tableau 56: Expérience n°4D: Effets du SLC13 (2.5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$, °°°: $p < .001$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .05$ par rapport à 2.5 mg/kg; **c**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg; **d**: $p < .05$ par rapport à 10 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 9 à 12 par lot.

* Lots traités avec le SLC13 : 2.5 mg/kg (N = 12) ;
5 mg/kg (N = 10) ;
10 mg/kg (N = 11) ;
20 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
* Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Etant donné que le SLC13 montrait des effets toxiques à partir de 10 mg/kg et des effets de type anxiolytique uniquement avec 5 mg/kg (expérience n°1D), une dose supplémentaire de 2.5 mg/kg a été ajoutée. De plus, à partir de cette expérience, nous avons tenté d'affiner le dépouillement des paramètres comportementaux en divisant les redressements en 2 catégories selon que les pattes antérieures étaient appuyées ou non sur une surface du dispositif (paroi verticale ou marche supérieure). En effet, les redressements représentent, avec les marches montées, les paramètres les plus représentatifs et les plus sensibles dans cette procédure. D'autre part, l'observation du comportement des animaux dans l'escalier au cours des expériences précédentes nous a conduit à cette distinction car les 2 types de redressements ne semblaient pas affectés de la même manière par les différents traitements.

Comme dans l'expérience n°1D, le SLC13 a causé des décès aux doses testées :
- 0 morts sur 12 rats avec 2.5 mg/kg ;
- 1 mort sur 9 rats avec 5 mg/kg, 66 mn après l'administration, c'est-à-dire 3 mn après le test ;
- 0 morts sur 11 rats avec 10 mg/kg ;
- 9 morts sur 10 rats avec 20 mg/kg, dont 8 moins de 2 mn après l'administration et 1 au bout de 8 h.

Les données de cette expérience nous ont permis de calculer une dose létale 50 du SLC13 d'après la méthode de Berkson (1953) : $DL_{50} = 12.0 \pm 0.2$. La DL_{50} reste donc assez proche des dosages employés dans l'étude comportementale.

L'effectif total passe donc de 76 à 67 pour les données comportementales, puisque 8 rats sont décédés avant le test et que le rat décédé après une administration de SLC13 à 5 mg/kg est décédé 3 mn après le test et n'a donc pas été pris en compte. Les résultats recueillis sont reportés dans le Tableau 56 et l'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 6, N = 67) :

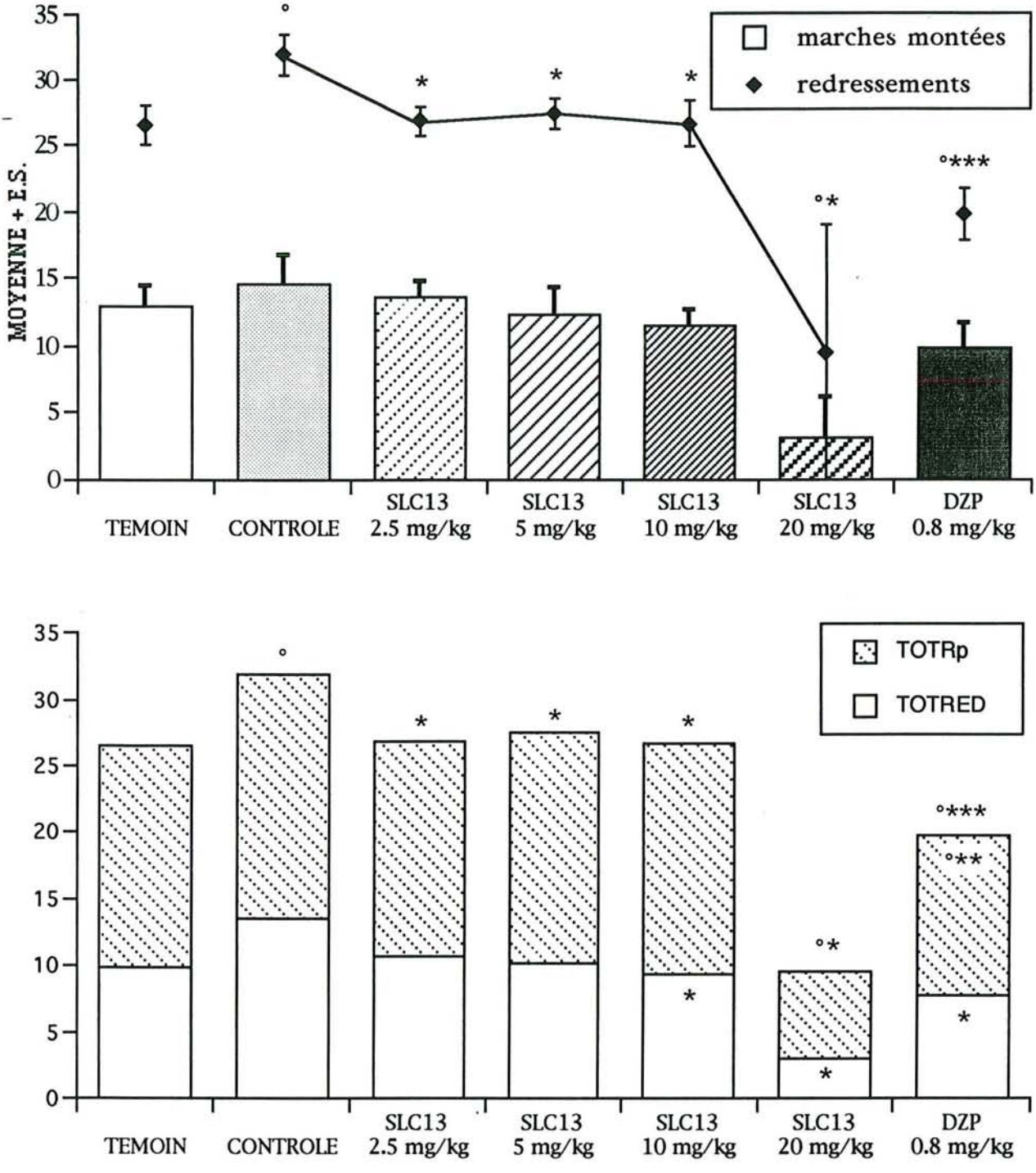


Figure 84: Expérience n°4D: Effets du SLC13 (2.5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

- ASC1 : H = 7.89 ; N.S.
- ASC2 : H = 11.30 ; N.S.
- ASC3 : H = 6.95 ; N.S.
- TOTASC : H = 10.39 ; N.S.
- DESC1 : H = 8.04 ; N.S.
- DESC2 : H = 13.33 ; p = .038
- DESC3 : H = 8.71 ; N.S.
- TOTDESC : H = 10.73 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 10.76 ; N.S.
- RED1 : H = 9.37 ; N.S.
- RED2 : H = 10.81 ; N.S.
- RED3 : H = 12.38 ; N.S.
- TOTRED : H = 13.91 ; p = .0307
- Rp1 : H = 14.47 ; p = .0248
- Rp2 : H = 7.56 ; N.S.
- Rp3 : H = 11.35 ; N.S.
- TOTRp : H = 16.33 ; p = .0121
- R+Rp1 : H = 17.26 ; p = .0084
- R+Rp2 : H = 14.59 ; p = .0237
- R+Rp3 : H = 15.27 ; p = .0182
- TOTRR : H = 23.17 ; p = .0007
- DEF1 : H = 13.52 ; p = .0355
- DEF2 : H = 10.06 ; N.S.
- DEF3 : H = 8.59 ; N.S.
- TOTDEF : H = 4.72 ; N.S.
- TOIL1 : H = 5.09 ; N.S.
- TOIL2 : H = 8.76 ; N.S.
- TOIL3 : H = 6.10 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 7.59 ; N.S.
- LAT M1 : H = 12.13 ; N.S.
- LAT M5 : H = 6.64 ; N.S.

Le véhicule d'injection provoque une augmentation, par rapport aux témoins, du nombre de redressements des 2 types effectués, significative pendant la première mn du test et pendant la durée totale du test. Cet effet ne correspondant pas à une activité sédative, on peut admettre que le véhicule est dépourvu d'effets secondaires pouvant interférer avec les activités des substances testées.

Le nombre total de marches montées n'est pas modifié par le SLC13 et le DZP du point de vue statistique, par rapport au lot contrôle (Figure 84). On observe toutefois une nette diminution de ce paramètre avec 20 mg de SLC13 par kg, mais cette diminution n'est pas significative, étant donné le faible effectif de ce lot (N = 2), lié aux nombreux décès (90%) provoqués par le SLC13 à cette dose.

Le nombre de marches descendues est modifié de façon statistiquement significative par les traitements pendant la deuxième mn du test. Lorsqu'on compare les lots traités par le DZP ou le SLC13 au lot contrôle, on observe une diminution de ce paramètre par rapport aux contrôles, statistiquement significative à partir de 20 mg de SLC13 par kg et avec 0.8 mg de DZP par kg. Le nombre total de marches descendues n'est pas modifié par les différents traitements, du point de vue statistique, mais montre une diminution dose-dépendante avec le SLC13 et une légère diminution avec le DZP. Le nombre total de marches montées ou descendues n'est pas significativement modifié du point de vue statistique. Ce paramètre diminue toutefois

avec les 2 substances et d'une manière dose-dépendante avec le SLC13, par rapport au lot contrôle.

En ce qui concerne les redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air, on observe une diminution statistiquement significative à partir de 10 mg/kg avec le SLC13, et avec 0.8 mg de DZP par kg (Figure 84). Quant aux redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif , on n'obtient de différence statistiquement significative entre le lot contrôle et les lots traités que pour le DZP 0.8 mg/kg qui effectue significativement moins de redressements que les contrôles. Si on cumule les 2 types de redressements, on obtient une diminution du nombre de redressements dans tous les lots traités (SLC 2.5 à 20 mg/kg et DZP 0.8 mg/kg) par rapport au lot contrôle.

Le nombre de toilettages n'est pas modifié par les différents traitements du point de vue statistique (Tableau 56). Par contre, les défécations présentent une hétérogénéité significative entre les lots pendant la première mn du test. La comparaison avec le lot contrôle ne montre aucune différence significative. Par contre, les lots traités avec 2.5 ou 5 mg de SLC13 par kg effectuent moins de défécations que le lot traité avec le DZP et le lot traité avec 20 mg de SLC13 par kg.

La latence de montée de la première marche est augmentée dans les lots traités avec 5 et 20 mg de SLC13 par kg, par rapport au lot contrôle, alors que la latence de montée de la dernière marche est augmentée par le SLC13 aux 4 doses testées et par le DZP, mais ces modifications ne sont pas significatives du point de vue statistique.

En résumé, l'activité locomotrice, représentée par le nombre de marches montées, n'est modifiée du point de vue statistique ni par le DZP, ni par le SLC13 aux doses testées. On observe, toutefois, une nette diminution avec 20 mg de SLC13 par kg, mais les données obtenues avec ce lot sont difficiles à analyser en raison de la forte toxicité du SLC13 et il s'agit probablement d'effets secondaires liés à la toxicité. Donc, le SLC13, aux doses inférieures à 20 mg/kg, et le DZP, à la dose de 0.8 mg/kg, ne présentent pas d'effet sédatif significatif.

Les redressements avec les pattes antérieures en l'air sont diminués par le SLC13 à partir de 5 mg/kg et par le DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Par contre, les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une des parois du dispositif ne sont affectés que par le DZP. Lorsqu'on additionne les 2 catégories de redressements, on obtient une diminution dans tous les lots traités par rapport au lot contrôle.

L'allongement de la période d'habituation aux conditions du laboratoire a donc permis la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec le DZP dans

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC14 5 mg/kg		SLC14 10 mg/kg		SLC14 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	2,5	0,5	4,2	0,5	3,1	0,7	2,7	0,5	4,8	1,0	4,5	0,5
ASC2	5,1	0,9	4,1	0,6	4,3	0,9	3,9	0,7	4,8	1,0	4,3	0,9
ASC3	4,0	0,9	4,3	0,8	4,9	0,6	5,4	0,9	5,8	0,9	3,0	1,0
TOTASC	11,6	1,9	12,5	1,3	12,3	1,7	12,0	1,6	15,3	2,5	11,8	1,8
DESC1	1,5	0,6	1,8	0,6	1,2 a	0,4	0,9 a	0,2	2,9 °abc	0,6	3,9 °°**	0,4
DESC2	3,9	1,0	3,6	0,6	4,5	1,1	3,6	0,6	5,0	0,9	3,5	1,0
DESC3	5,0	0,9	4,9	0,7	5,3	0,7	5,8	1,1	6,2	1,2	2,6	0,9
TOTDESC	10,4	2,0	10,4	1,2	11,0	1,6	10,3	1,5	14,1	2,4	10,0	1,4
MARCHES TOT	22,0	3,8	22,9	2,5	23,3	3,3	22,3	3,0	29,4	4,9	21,8	3,2
RED1	0,5	0,2	1,7	0,5	1,4	0,4	1,1	0,4	1,2	0,4	0,6	0,3
RED2	4,2	1,2	4,8	0,7	2,8	0,6	3,1	0,9	4,5	1,0	2,2	0,7
RED3	5,4	0,6	6,4	1,2	4,0	0,9	3,0 °*	0,6	6,1 ac	0,9	2,0 °°**	0,8
TOTRED	10,1	1,4	12,9	1,1	8,2 **a	1,1	7,2 **	1,3	11,8 a	1,6	4,8 °°**	1,5
Rp1	5,1	0,4	6,7	0,6	6,4	0,5	6,5	0,7	6,9	0,8	5,8	0,5
Rp2	5,8	0,8	5,0	0,6	6,2 a	0,5	6,2 a	0,5	5,9 a	0,5	3,1 °*	0,5
Rp3	6,7	0,8	5,5	0,7	5,0 a	0,5	5,9 a	0,9	5,9 a	0,4	2,2 °°°**	0,4
TOTRp	17,6	1,4	17,3	1,3	17,6 a	1,2	18,6 a	1,3	18,8 a	1,3	11,1 °°**	1,1
R+Rp1	5,6	0,5	8,5	0,9	7,8	0,6	7,6	0,8	8,1	0,9	6,4	0,7
R+Rp2	10,0	1,6	9,8	1,1	9,0 a	0,8	9,3 a	1,0	10,4 a	0,9	5,3 **	0,8
R+Rp3	12,1	1,0	11,9	1,6	9,0 a	1,2	8,9 a	0,9	12,0 ab	1,0	4,2 °°°**	1,0
TOTRR	27,7	2,1	30,2	2,1	25,8 a	1,8	25,8 a	1,7	30,5 a	1,8	15,9 °°***	2,0
DEF1	0,0	0,0	0,5	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,3
DEF2	0,3	0,3	0,6	0,4	0,6	0,4	0,3	0,3	0,6	0,4	0,4	0,3
DEF3	0,4	0,3	0,5	0,4	0,0	0,0	0,4	0,4	0,9	0,4	0,6	0,4
TOTDEF	0,7	0,4	1,6	0,7	0,9	0,6	0,9	0,6	1,6	0,8	1,5	0,6
TOIL1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
TOIL2	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,6	0,3	0,3	0,2
TOIL3	0,7	0,3	0,4	0,2	0,6	0,3	0,6	0,2	0,4	0,1	0,4	0,2
TOTTOIL	0,8	0,2	0,8	0,3	0,7	0,3	0,9	0,3	1,0	0,3	0,8	0,3
LAT M1	32,2	7,4	18,5	3,9	33,5	8,7	30,8	6,4	17,0	3,9	14,6	2,0
LAT M5	103,8	17,5	112,5	18,3	116,3	15,7	121,8	17,0	105,6	18,6	98,5	19,5

Tableau 57: Expérience n°5D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$, °°°: $p < .001$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport au DZP; b: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg; c: $p < .05$ par rapport à 10 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 10 à 12 par lot.

cette expérience. Lorsqu'on compare les données des lots traités avec le SLC à celles obtenues avec le DZP, on distingue des différences statistiquement significatives pour les 3 doses les plus faibles. Le lot traité avec 20 mg de SLC13 par kg ne montre pas de différence statistique avec le lot traité avec le DZP, mais en raison du faible effectif et de la forte toxicité associée à cette dose, on ne peut pas considérer que leurs effets comportementaux sont comparables. Par conséquent, le SLC13 ne produit pas, aux doses testées, un profil comportemental tout à fait comparable à celui du DZP, l'activité du DZP étant plus marquée que celle du SLC13. Plus précisément, la diminution des redressements provoquée par le DZP est beaucoup plus importante que celle provoquée par le SLC13, particulièrement en ce qui concerne les redressements avec les pattes postérieures appuyées contre une paroi du dispositif. En supposant que le SLC13 provoque effectivement une libération centrale de GABA, il semblerait donc que l'augmentation cérébrale de l'activité GABAergique provoque des effets comportementaux légèrement différents de ceux des BZD.

E. Expérience n°5D : Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 63 rats mâles Wistar de 160-210 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 10) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 11) ;
  * Lots traités avec le SLC14 : 5 mg/kg (N = 10) ;
    10 mg/kg (N = 10) ;
    20 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

L'analyse des résultats présentés dans le Tableau 57, par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 63) :

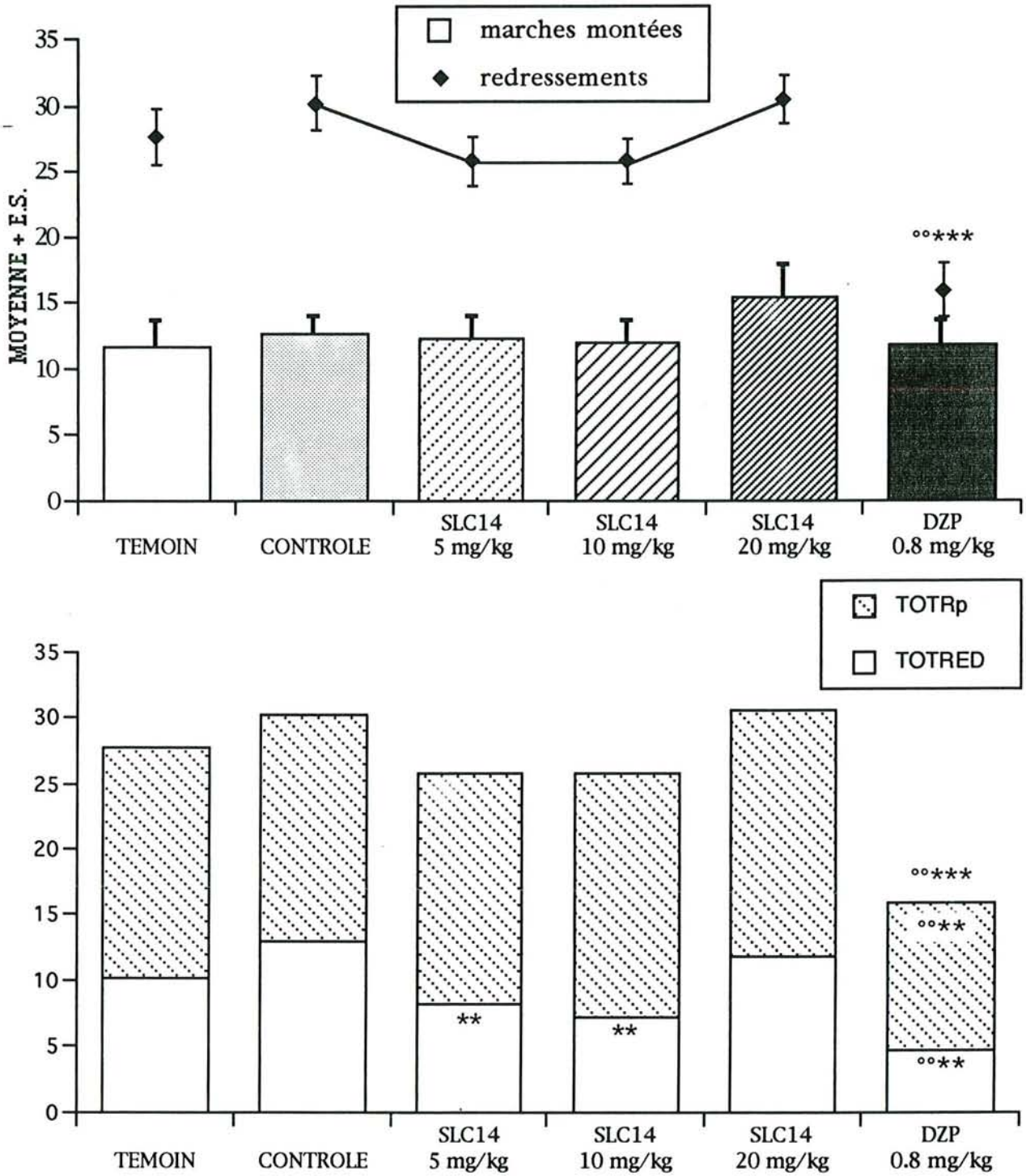


Figure 85: Expérience n°5D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

- ASC1 : H = 10.35 ; N.S.
- ASC2 : H = 0.80 ; N.S.
- ASC3 : H = 6.55 ; N.S.
- TOTASC : H = 2.17 ; N.S.
- DESC1 : H = 23.17 ; p = 0003
- DESC2 : H = 2.13 ; N.S.
- DESC3 : H = 8.64 ; N.S.
- TOTDESC : H = 2.56 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 2.53 ; N.S.
- RED1 : H = 6.09 ; N.S.
- RED2 : H = 8.31 ; N.S.
- RED3 : H = 17.38 ; p = .0038
- TOTRED : H = 19.77 ; p = .0014
- Rp1 : H = 5.61 ; N.S.
- Rp2 : H = 15.94 ; p = .007
- Rp3 : H = 20.35 ; p = .0011
- TOTRp : H = 16.42 ; p = .0058
- R+Rp1 : H = 10.34 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 13.56 ; p = .0186
- R+Rp3 : H = 22.61 ; p = .0004
- TOTRR : H = 21.60 ; p = .0006
- DEF1 : H = 4.18 ; N.S.
- DEF2 : H = 1.60 ; N.S.
- DEF3 : H = 6.31 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.18 ; N.S.
- TOIL1 : H = 4.08 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.49 ; N.S.
- TOIL3 : H = 1.73 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 0.62 ; N.S.
- LAT M1 : H = 9.09 ; N.S.
- LAT M5 : H = 1.46 ; N.S.

Les paramètres modifiés significativement par les différents traitements sont le nombre de marches descendues pendant la première mn et les 2 types de redressements. La comparaison témoin/contrôle montre que le véhicule d'injection ne modifie pas significativement le comportement du rat dans l'escalier (Tableau 57).

Le DZP augmente significativement le nombre de marches descendues pendant la première mn, par rapport aux lots témoin et contrôle. Il diminue significativement le nombre de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air, pendant la troisième mn et pendant la durée totale du test, par rapport aux lots témoin et contrôle (Figure 85). De même, il diminue d'une manière statistiquement significative le nombre de redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, pendant la deuxième et la troisième mn et pendant la durée totale du test. Ainsi, le cumul des 2 types de redressements montre également une diminution statistiquement significative avec le DZP, pendant pendant la deuxième et la troisième mn et pendant la durée totale du test, par rapport aux contrôles (Figure 85). Le nombre de marches montées (Figure 85), les défécations, les toilettages et les latences de montée des marches 1 et 5 ne sont pas modifiés significativement par le DZP, par rapport aux lots témoin et contrôle (Tableau 57).

Aux doses testées, le SLC14 ne modifie pas significativement le nombre de marches montées (Figure 85), le nombre de marches descendues (Tableau 57), les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif,

le nombre total de redressements des 2 types (Figure 85), les défécations, les toilettages et les latences de montée des première et dernière marche du dispositif (Tableau 57). Par contre, il diminue, d'une manière statistiquement significative, le nombre total de redressements avec les pattes antérieures en l'air, aux 2 plus faibles doses (Figure 85).

L'activité locomotrice, dans le dispositif (marches montées ou descendues), n'est donc diminuée ni par le DZP ni par le SLC14 aux doses testées (Tableau 57). On observe même une augmentation significative du nombre de marches descendues pendant la première mn avec le DZP (Tableau 57) et une augmentation, toutefois non significative, de l'activité locomotrice avec 20 mg de SLC14 par kg. Les redressements avec les pattes antérieures en l'air diminuent dans les lots traités avec le DZP ou avec le SLC14 à 5 et 10 mg/kg, mais pas avec 20 mg de SLC14 par kg (Figure 85). Par contre, les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, ainsi que le total des 2 types de redressements, ne sont diminués que par le DZP.

En résumé, le DZP et le SLC14 n'entrainent pas de modification de l'activité locomotrice aux doses testées. Mais seul, le DZP montre une diminution significative du nombre total de redressements effectués. Le DZP montre donc un profil de type anxiolytique dans cette expérience, à la dose de 0.8 mg/kg. Il n'en est pas de même pour le SLC14 qui n'affecte que les redressements avec les pattes antérieures en l'air et seulement aux 2 plus faibles doses testées. Le SLC14, comme le SLC13 dans l'expérience précédente, n'a donc pas exactement le même effet que le DZP sur le comportement des rats dans le test de l'escalier. Or, Anderson *et al.* (1987a) ont mis en évidence un effet anxiolytique dans le test de conflit choc électrique-boisson, avec le SLC14 (4-25 mg/kg i.v.) atteignant un maximum 2 h après le traitement et se prolongeant jusqu'à 8 h après le traitement. Aucun effet significatif n'était observé 30 mn après le traitement. Dans les conditions du test de l'escalier, ne présentant ni contrainte alimentaire ni composante douloureuse, le SLC14 ne montre pas d'effet de type anxiolytique. On peut supposer que les effets observés dans le test de conflit choc électrique-boisson étaient peut être liés à une modification de la sensibilité à la douleur ou de la soif, par le SLC14. Les auteurs ont vérifié l'absence d'effets analgésiques et sédatifs du SLC14 aux doses testées après 2 h, mais n'ont pas vérifié les éventuels effets du SLC14 sur la soif. Par conséquent, il est possible que les effets de type anxiolytique observés par Anderson *et al.* (1987a) soient liés à une activité du SLC14 sur la soif, ce qui expliquerait l'absence d'effets du SLC14 dans le test de l'escalier. Etant donné que le maximum d'activité dans le test de conflit choc électrique-boisson était observé 2 h après le traitement et que le test de l'escalier a été réalisé 1 h après le traitement, l'absence d'activité pourrait être imputable à un temps d'activité trop court. Nous avons donc évalué l'activité du SLC14 dans le test de l'escalier 2 h après son administration, dans l'expérience n°10D.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC15 5 mg/kg		SLC15 10 mg/kg		SLC15 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	3,9	0,8	2,8	0,5	5,0	0,6	3,5	0,7	3,0	0,6	2,5	0,5
ASC2	3,8	0,5	4,1	0,5	5,2	0,6	4,3	0,7	2,9	0,6	3,5	0,6
ASC3	6,2	1,0	4,8	0,6	4,1	0,7	5,9	0,8	4,9	0,8	3,3	0,8
TOTASC	13,9	1,8	11,8	0,7	14,3	1,3	13,8	1,4	10,8	1,5	9,3	1,3
DESC1	1,8	0,5	0,6 °	0,3	2,4 **	0,5	1,7 *	0,4	1,0 b	0,5	1,5 *	0,4
DESC2	4,1	0,8	4,5	0,6	5,4	0,7	4,5	0,8	3,1	0,6	3,1	0,5
DESC3	5,3	0,7	4,7	0,7	5,7 a	0,7	6,6 a	0,8	4,5 c	0,8	2,8 °	0,5
TOTDESC	11,2	1,6	9,8	0,9	13,5 *a	1,2	12,8 a	1,5	8,6 b	1,5	7,5	1,1
MARCHES TOT	25,1	3,3	21,5	1,5	27,8 *a	2,4	26,6 a	2,9	19,4 b	2,9	16,8 °	2,4
RED1	2,1	0,8	1,7	0,3	1,8	0,6	2,0	0,5	1,0	0,4	0,5	0,2
RED2	3,8	0,7	3,5	0,9	5,0	0,6	3,3	0,6	3,7	0,7	2,3	0,5
RED3	4,9	0,8	4,8	0,6	5,2	0,6	5,5	1,0	3,5	0,5	2,7	0,7
TOTRED	10,8	1,9	9,9	1,2	12,0 a	1,2	10,8 a	1,9	8,2 b	0,9	5,5 °*	1,0
Rp1	6,0	0,7	7,8	0,9	6,5	0,5	7,5	0,6	6,1	0,5	5,8	0,5
Rp2	5,9	0,6	6,3	0,8	6,6	0,6	6,4	0,8	5,8	0,7	4,6	0,5
Rp3	5,9	0,6	7,1	0,8	4,5 **	0,4	6,8 ab	0,8	6,8 ab	0,7	3,1 °°**	0,6
TOTRp	17,8	0,7	21,2	1,4	17,6 *a	0,9	20,7 °a	1,2	18,7 a	1,3	13,5 °°***	1,0
R+Rp1	8,1	1,0	9,4	1,0	8,2	1,0	9,5	0,9	7,1	0,5	6,4	0,6
R+Rp2	9,7	1,0	9,8	1,0	11,6 a	0,8	9,7 a	0,8	9,4 a	1,2	6,9 °**	0,4
R+Rp3	10,8	1,0	11,8	1,0	9,8 a	0,8	12,3 a	1,4	10,3 a	0,9	5,8 °°**	1,1
TOTRR	28,6	1,9	31,1	2,2	29,6 a	2,0	31,5 a	2,2	26,8 a	1,6	19,1 °°***	1,4
DEF1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1
DEF2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2 *bc	0,5	0,2	0,2
DEF3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,5	0,3	0,6	0,3	0,8	0,4
TOTDEF	0,3	0,3	0,0	0,0	0,2	0,2	0,5	0,3	1,8 *b	0,6	1,1 *	0,5
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,7	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,1	0,4	0,2	0,2	0,1
TOIL3	0,5	0,2	0,5	0,2	1,0	0,3	0,7	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2
TOTTOIL	1,2	0,5	0,7	0,2	1,2	0,3	1,1	0,2	0,9	0,3	0,6	0,2
LAT M1	28,8	9,3	32,6	6,3	15,7	3,4	18,3	4,3	26,8	5,6	29,9	4,8
LAT M5	97,8	17,2	133,1	18,3	70,8	13,4	111,0	16,2	129,8	17,8	131,7	16,8

Tableau 58: Expérience n°6D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg; **c**: $p < .05$ par rapport à 10 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 12 à 13 par lot.

F. Expérience n°6D : Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v.) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 75 rats mâles Wistar de 160-210 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;
  * Lots traités avec le SLC15 : 5 mg/kg (N = 13) ;
    10 mg/kg (N = 13) ;
    20 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 13), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

L'analyse des paramètres par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 75) :

- ASC1 : H = 9.89 ; N.S.
- ASC2 : H = 7.86 ; N.S.
- ASC3 : H = 9.18 ; N.S.
- TOTASC : H = 10.89 ; N.S.
- DESC1 : H = 13.26 ; p = 021
- DESC2 : H = 8.76 ; N.S.
- DESC3 : H = 14.77 ; p = .0114
- TOTDESC : H = 16.76 ; p = .005
- MARCHES TOT : H = 13.88 ; p = .0164
- RED1 : H = 8.34 ; N.S.
- RED2 : H = 8.16 ; N.S.
- RED3 : H = 10.24 ; N.S.
- TOTRED : H = 14.85 ; p = .011
- Rp1 : H = 6.53 ; N.S.
- Rp2 : H = 7.04 ; N.S.
- Rp3 : H = 21.40 ; p = .0007
- TOTRp : H = 21.58 ; p = .0006
- R+Rp1 : H = 9.05 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 16.87 ; p = .0048
- R+Rp3 : H = 17.41 ; p = .0038
- TOTRR : H = 22.74 ; p = .0004
- DEF1 : H = 4.07 ; N.S.
- DEF2 : H = 18.49 ; p = .0024
- DEF3 : H = 7.41 ; N.S.
- TOTDEF : H = 11.22 ; p = .0472
- TOIL1 : H = 4.77 ; N.S.
- TOIL2 : H = 1.85 ; N.S.
- TOIL3 : H = 3.63 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 3.53 ; N.S.
- LAT M1 : H = 7.37 ; N.S.
- LAT M5 : H = 10.02 ; N.S.

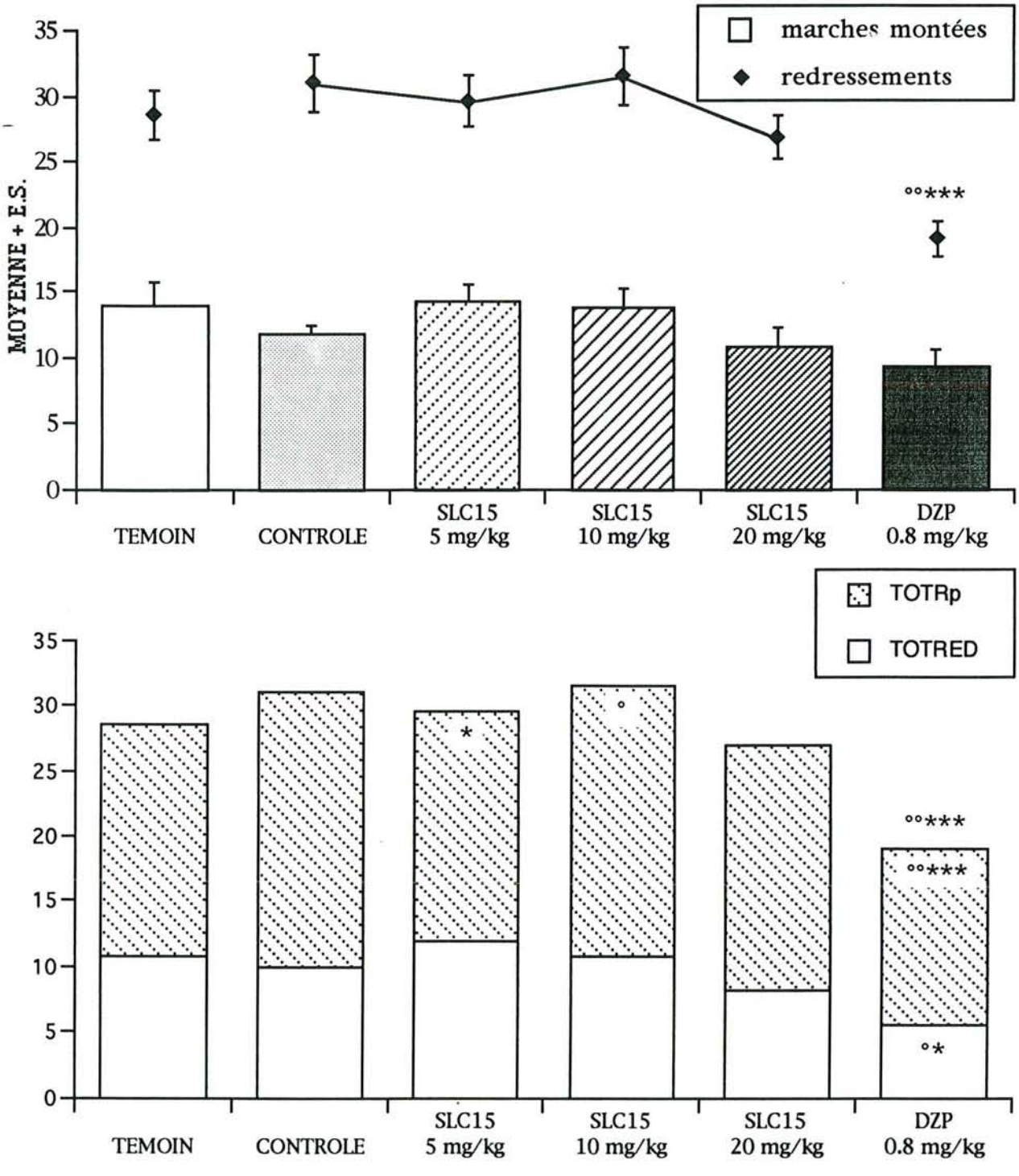


Figure 86: Expérience n°6D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

Le véhicule d'injection provoque uniquement une diminution statistiquement significative du nombre de marches descendues pendant la première mn du test (Tableau 58). Il n'entraîne donc pas de modifications majeures du comportement dans le test.

Le nombre de marches montées n'est pas modifié du point de vue statistique par les différents traitements (Figure 86). Toutefois, on observe une augmentation, non significative, de ce paramètre avec le SLC15, se réduisant d'une manière dose-dépendante pour retourner au niveau des contrôles avec 20 mg/kg. Par contre, le nombre de marches descendues présente une hétérogénéité significative dans le test de Kruskal-Wallis pendant la première et la troisième mn du test et pendant la durée totale du test. On observe une augmentation, significative du point de vue statistique, du nombre de marches descendues pendant la première mn, par rapport au lot contrôle, avec 5 et 10 mg de SLC15 par kg, augmentation qui a disparu avec 20 mg/kg (Tableau 58). Le DZP à la dose de 0.8 mg/kg induit également une augmentation statistiquement significative de ce paramètre par rapport au lot contrôle. Quant au nombre total de marches montées et descendues pendant les 3 mn du test, il augmente de façon statistiquement significative avec 5 mg de SLC15 par kg (Tableau 58). Les autres traitements ne modifient pas significativement ce paramètre. Les redressements avec les pattes antérieures en l'air ne sont modifiés que par le DZP qui en diminue l'apparition de façon statistiquement significative à la dose testée (Figure 86). Le SLC15 a tendance à augmenter ces redressements avec la plus faible dose, mais cette augmentation n'est pas significative du point de vue statistique. Les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif ne sont diminués qu'avec 5 mg de SLC15 par kg et 0.8 mg de DZP par kg. La diminution provoquée par le SLC15 est cependant moins importante que celle provoquée par le DZP (Tableau 58). Quand on additionne les 2 types de redressements, on obtient seulement une diminution statistiquement significative avec 0.8 mg de DZP par kg. Le SLC15 tend à diminuer ce paramètre d'une manière dose-dépendante mais n'atteint pas un niveau statistiquement significatif aux doses testées. Donc, le DZP diminue les 2 types de redressements, alors que le SLC15 ne diminue que les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, et ce, uniquement à la plus faible dose testée. Les toilettages, défécations et latences de montée des marches 1 et 5 ne sont pas modifiés par les différents traitements du point de vue statistique, mise à part une augmentation statistiquement significative du nombre de défécations dans les lots traités avec 20 mg de SLC15 par kg ou 0.8 mg de DZP par kg, par rapport au lot contrôle.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC17 5 mg/kg		SLC17 10 mg/kg		SLC17 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	2,9	0,7	4,0	0,5	4,3	0,5	4,9	0,7	4,5	0,6	4,8	0,9
ASC2	4,7	0,7	6,9	0,6	5,7	0,6	5,7	0,7	5,3	0,5	6,3	0,9
ASC3	5,1	0,8	6,4	0,7	6,2	1,1	5,3	0,9	6,5	0,8	5,6	1,0
TOTASC	12,7	1,7	17,3	0,9	16,1	1,5	15,9	1,9	16,3	1,4	16,7	2,0
DESC1	1,7	0,5	2,8	0,7	2,5	0,6	3,5	0,8	2,7	0,6	3,4	0,6
DESC2	3,8	0,8	6,1	0,5	6,6	0,8	5,3	0,6	5,6	0,8	5,9	0,7
DESC3	5,1	0,9	6,6	0,8	6,3	0,7	4,8	1,0	6,2	1,0	6,0	0,9
TOTDESC	10,6	1,7	15,5	1,2	15,3	1,5	13,6	1,8	14,4	1,5	15,3	1,8
MARCHES TOT	23,3	3,4	32,8	2,0	31,4	3,0	29,5	3,6	30,8	2,9	32,0	3,8
RED1	1,4	0,4	0,9	0,2	1,6	0,4	0,8	0,3	1,8	0,5	0,7	0,3
RED2	3,8	0,9	4,1	1,0	4,5	0,6	4,2	0,7	4,1	0,6	2,7	0,7
RED3	4,8	1,2	4,1	0,6	4,7	0,7	4,4	0,8	5,0	0,7	2,6	0,6
TOTRED	10,1	2,2	9,1	1,2	10,8	1,1	9,4	1,5	10,8	1,3	6,1	1,0
Rp1	9,0	1,0	9,9	0,7	8,8	0,6	8,2	0,6	8,9	0,5	8,2	0,8
Rp2	7,6	0,8	8,2	0,6	7,9 a	0,8	7,6	0,8	5,8 °*b	0,6	5,3 °**	0,8
Rp3	7,4	0,5	9,2	0,8	6,3 *	0,8	6,8 *	0,6	6,8	0,8	5,1 °°**	0,7
TOTRp	24,0	1,8	27,2	1,5	23,1 a	1,5	22,6 a	1,1	21,5 *	1,3	18,5 °***	1,4
R+Rp1	10,4	1,2	10,8	0,8	10,4	0,7	9,0	0,7	10,7	0,8	8,9	0,7
R+Rp2	11,4	1,3	12,2	1,2	12,4 a	1,1	11,8 a	1,1	9,8	0,8	8,0 °**	0,9
R+Rp3	12,3	1,3	13,2	1,1	11,0 a	1,2	11,3 a	1,1	11,8 a	1,3	7,7 °°**	0,9
TOTRR	34,1	3,5	36,3	2,1	33,8 a	2,2	32,0 a	2,0	32,3 a	2,0	24,6 °***	1,8
DEF1	0,0	0,0	0,6	0,4	0,3	0,1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,9	0,4
DEF2	0,8	0,4	0,2	0,2	0,3	0,2	0,0	0,0	0,5	0,4	0,5	0,2
DEF3	0,8	0,4	0,5	0,4	0,8	0,4	0,9	0,4	0,4	0,2	0,8	0,4
TOTDEF	1,5	0,6	1,3	0,7	1,4	0,5	1,3	0,4	1,3	0,6	2,2	0,9
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0
TOIL2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,5	0,2
TOIL3	0,4	0,2	0,4	0,1	0,5	0,2	0,5	0,2	0,3	0,1	0,4	0,2
TOTTOIL	0,5	0,2	0,5	0,2	0,7	0,2	0,8	0,2	0,9	0,3	0,8	0,2
LAT M1	34,0	4,7	29,2	4,7	20,3 °°	2,8	19,3 °	5,5	22,8 °	2,4	16,7 °°	2,3
LAT M5	122,5	15,4	89,0	12,5	71,8	14,3	82,4	15,8	88,3	16,3	82,6	15,4

Tableau 59: Expérience n°7D: Effets du SLC17 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 11 à 13 par lot.

Au vu de ces résultats, il apparaît que les conditions expérimentales journalières permettaient la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique avec 0.8 mg de DZP par kg, c'est-à-dire pas de diminution du nombre de marches montées à une dose qui diminue le nombre de redressements. Toutefois, le produit étudié (SLC15) n'a pas montré un profil de ce type aux doses testées. Le SLC15 ne diminue pas l'activité locomotrice, il induit même une légère augmentation à la plus faible dose testée. Mais, il ne modifie ni le nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, ni le nombre total de redressements. Il provoque uniquement une diminution des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif à la dose de 5 mg/kg. Aucune des doses de SLC15 testées ne montre un profil comportemental comparable à celui du DZP du point de vue statistique (Tableau 58).

G. Expérience n°7D : Effets du SLC17 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 72 rats mâles Wistar de 160-210 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 13) ;
  * Lots traités avec le SLC17 : 5 mg/kg (N = 12) ;
    10 mg/kg (N = 12) ;
    20 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 11), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Le SLC17 contient un transporteur de type quinoléine, comme le SLC15, mais, contrairement au SLC15 contenant une molécule de nipécotate, la quinoléine est combinée à une molécule de GABA pour former le SLC17. De même que le SLC15, il ne montre aucune toxicité aux doses testées. L'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les résultats suivants (DDL = 5, N = 72) :

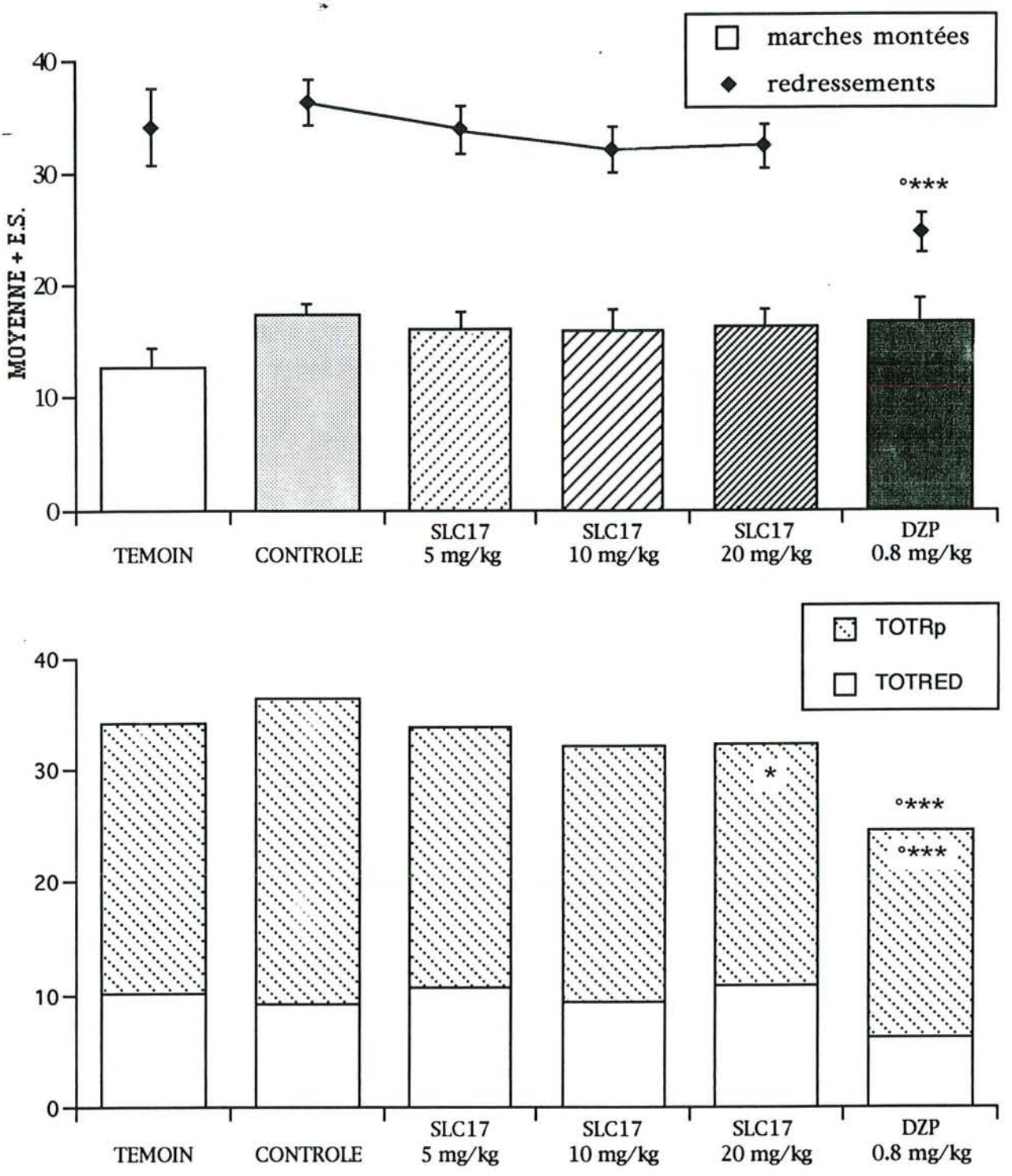


Figure 87: Expérience n°7D: Effets du SLC17 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

- ASC1 : H = 6.51 ; N.S.
- ASC2 : H = 5.67 ; N.S.
- ASC3 : H = 4.04 ; N.S.
- TOTASC : H = 5.86 ; N.S.
- DESC1 : H = 4.60 ; N.S.
- DESC2 : H = 8.20 ; N.S.
- DESC3 : H = 2.46 ; N.S.
- TOTDESC : H = 7.54 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 6.95 ; N.S.
- RED1 : H = 5.56 ; N.S.
- RED2 : H = 4.05 ; N.S.
- RED3 : H = 6.24 ; N.S.
- TOTRED : H = 7.70 ; N.S.
- Rp1 : H = 3.10 ; N.S.
- Rp2 : H = 13.74 ; p = .0173
- Rp3 : H = 13.44 ; p = .0196
- TOTRp : H = 14.10 ; p = .015
- R+Rp1 : H = 4.41 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 12.12 ; p = .0332
- R+Rp3 : H = 12.93 ; p = .0241
- TOTRR : H = 13.02 ; p = .0232
- DEF1 : H = 7.00 ; N.S.
- DEF2 : H = 4.69 ; N.S.
- DEF3 : H = 1.90 ; N.S.
- TOTDEF : H = 1.12 ; N.S.
- TOIL1 : H = 5.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 6.64 ; N.S.
- TOIL3 : H = 0.52 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 3.31 ; N.S.
- LAT M1 : H = 13.92 ; p = .0161
- LAT M5 : H = 6.26 ; N.S.

La comparaison témoin/contrôle montre que, dans cette expérience, le véhicule d'injection n'affecte significativement aucun des paramètres pris en compte (Tableau 59).

Les nombres de marches montées et descendues ainsi que les redressements avec les pattes antérieures en l'air ne sont pas modifiés par les traitements du point de vue statistique (Tableau 59). Par contre, les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif diminuent de façon statistiquement significative avec le DZP et le SLC17, par rapport au lot contrôle (Figure 87). On observe une diminution dose-dépendante du nombre total de redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif avec le SLC17, statistiquement significative à partir de 20 mg/kg (Figure 87). Avec 5 et 10 mg/kg, la diminution n'est significative que pendant la troisième mn. Le DZP en diminue significativement le nombre pendant la deuxième et la troisième mn et pendant la durée totale du test. La comparaison DZP/SLC17 montre que seule la diminution produite avec 20 mg de SLC17 par kg est comparable à celle produite par le DZP (Tableau 59). Le cumul des 2 types de redressements (Figure 87) montre uniquement une diminution significative dans le lot traité avec le DZP, par rapport aux lots témoin et contrôle. Les défécations et toilettages ne sont pas affectés significativement par le DZP et le SLC17. La latence de montée de la première marche, par contre, est modifiée par les différents traitements mais uniquement lorsque l'on compare les lots traités au lot témoin. Dans ce cas, on constate une diminution

statistiquement significative dans les lots traités avec 5, 10 ou 20 mg de SLC17 par kg ou avec le DZP (Tableau 59). Par contre, lorsqu'on les compare au lot contrôle, on n'observe aucune modification significative.

En résumé, le DZP montre un effet de type anxiolytique, comme dans les expériences précédentes réalisées dans les mêmes conditions : il diminue le nombre total de redressements effectués sans modifier le nombre de marches montées. Cependant, dans cette expérience, la diminution des redressements avec les pattes antérieures en l'air provoquée par le DZP n'atteint pas le niveau de significativité statistique. Comme le DZP, le SLC17 ne modifie pas l'activité locomotrice et diminue uniquement les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, et ceci de manière dose-dépendante, mais cette diminution n'est significative qu'à la plus forte dose testée. Par contre, il ne diminue pas le cumul des 2 types de redressements et aucune des doses de SLC17 testées ne conduit à un profil comportemental statistiquement comparable au DZP sur l'ensemble des paramètres (Tableau 59). Il est possible que des doses plus importantes montrent des activités différentes. Malheureusement, en raison de problèmes de solubilité, des dosages plus élevés n'étaient pas réalisables dans le même véhicule d'injection en maintenant le volume de solution injectée à 0.5 ml/kg.

Les SLC15 et 17 contiennent la même molécule de transporteur (quinoléine) rattachée à une molécule de nipécotate pour le SLC15 et à une molécule de GABA pour le SLC17. Aucun des 2 ne montre un effet comportemental comparable à celui du DZP dans les conditions expérimentales employées. Donc, dans les conditions expérimentales utilisées, soit la structure de ce transporteur n'est pas adéquate pour produire un transport efficace à travers la BHE *in vivo*, soit l'augmentation cérébrale de l'activité GABAergique provoque des effets comportementaux différents de ceux des BZD.

H. Expérience n°8D : Effets du SLC18 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 66 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC18 5 mg/kg		SLC18 10 mg/kg		SLC18 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	1,9	0,5	3,7	0,6	2,0	0,6	3,0	0,7	3,4	0,6	3,1	0,5
ASC2	4,6	0,5	6,8 °°	0,5	4,7	0,8	7,4 °ab	0,9	6,4	1,0	3,8 *	0,9
ASC3	5,3	0,8	5,4	0,3	5,4	0,9	7,2	0,7	5,7	0,9	3,5	0,8
TOTASC	11,8	1,4	15,8	1,1	12,1	1,9	17,7 °°ab	1,7	15,6	2,0	10,3 *	1,7
DESC1	0,8	0,3	1,7	0,4	1,6	0,6	1,7	0,4	1,9	0,7	1,4	0,5
DESC2	3,3	0,6	5,6	0,9	3,5	0,7	6,1	1,1	5,9	0,9	4,1	0,7
DESC3	6,2	0,8	5,8	0,6	5,2	0,8	6,4	0,8	6,1	0,9	3,2	0,7
TOTDESC	10,3	1,4	13,0	1,1	10,3	1,7	14,2	1,6	13,9	2,0	8,7	1,4
MARCHES TOT	22,1	2,7	28,8	2,1	22,3	3,6	31,9	3,2	29,4	4,0	19,0	3,1
RED1	0,8	0,3	2,0	0,6	1,0	0,3	0,7	0,2	0,7	0,4	0,6	0,3
RED2	2,3	0,6	4,6 °	0,6	2,8 *	0,5	4,1 a	0,6	3,0	0,7	2,0 **	0,6
RED3	5,0	0,9	7,3	1,0	4,4 *	0,9	6,9 ab	0,8	4,6	0,9	2,4 °**	0,7
TOTRED	8,1	1,3	13,9 °	1,8	8,2 *	1,3	11,7 a	1,3	8,2 *	1,6	5,0 ***	1,1
Rp1	6,8	0,8	7,6	0,5	7,4	0,7	8,8	0,9	8,1	0,9	7,5	0,7
Rp2	8,2	0,6	8,8	0,7	8,8 a	0,8	8,1 a	0,6	9,3 a	0,9	5,0 °**	0,7
Rp3	7,1	0,7	6,7	0,5	8,1 a	0,6	7,1 a	0,7	7,7 a	0,8	3,5 °**	0,7
TOTRp	22,1	1,6	23,1	1,2	24,3 a	1,5	24,0 a	1,1	25,1 a	1,8	16,0 °**	1,5
R+Rp1	7,6	1,0	9,6	0,8	8,4	0,7	9,4	1,0	8,8	0,9	8,1	0,7
R+Rp2	10,5	1,0	13,4 °	0,9	11,5 a	0,8	12,2 a	0,6	12,3 a	1,2	7,0 °***	0,7
R+Rp3	12,1	1,2	14,0	1,1	12,5 a	1,1	14,0 a	1,2	12,2 a	1,2	5,9 °***	1,2
TOTRR	30,2	2,2	37,0	2,3	32,4 a	2,0	35,7 a	2,2	33,3 a	2,3	21,0 °***	1,8
DEF1	0,4	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,3
DEF2	0,6	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,3	0,2
DEF3	0,8	0,5	0,6	0,3	0,4	0,3	0,3	0,2	0,4	0,4	0,4	0,3
TOTDEF	1,8	0,9	0,8	0,4	0,8	0,4	0,3	0,2	0,6	0,6	1,1	0,5
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,3	0,3	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1
TOIL3	0,3	0,1	0,3	0,1	0,5	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2	0,6	0,1
TOTTOIL	0,6	0,3	0,3	0,1	0,5	0,3	0,3	0,2	0,6	0,3	0,7	0,1
LAT M1	41,6	5,7	29,5	4,4	52,4	9,5	30,2	7,3	23,8	4,8	40,0	13,5
LAT M5	131,7	13,0	97,3	10,8	128,3	15,2	92,8	12,5	96,4	18,2	120,8	16,7

Tableau 60: Expérience n°8D: Effets du SLC18 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 9 à 12 par lot.

* Lots traités avec le SLC18 : 5 mg/kg (N = 12) ;
10 mg/kg (N = 9) ;
20 mg/kg (N = 9), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

* Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Le SLC18 et le SLC13 contiennent le même transporteur de type mixte, mais, le SLC13 contient une molécule de GABA, alors que le SLC18 contient une molécule de nipécotate. Contrairement au SLC13, il ne montre aucune toxicité aux doses testées. Par conséquent, le GABA n'étant pas toxique, la toxicité liée au SLC13 n'est probablement pas causée par le transporteur seul mais par le complexe transporteur de type mixte-GABA, puisque lorsque ce même transporteur est combiné au nipécotate, le caractère toxique disparaît, tout au moins à des dosages équivalents.

L'analyse des données comportementales par le test de Kruskal-Wallis donne les résultats suivants (DDL = 5, N = 66) :

- ASC1 : H = 7.93 ; N.S.
- ASC2 : H = 15.00 ; p = .0104
- ASC3 : H = 9.62 ; N.S.
- TOTASC : H = 11.86 ; p = .0368
- DESC1 : H = 3.51 ; N.S.
- DESC2 : H = 10.23 ; N.S.
- DESC3 : H = 9.71 ; N.S.
- TOTDESC : H = 8.97 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 10.72 ; N.S.
- RED1 : H = 7.68 ; N.S.
- RED2 : H = 12.49 ; p = .0287
- RED3 : H = 17.27 ; p = .004
- TOTRED : H = 18.73 ; p = .0022
- Rp1 : H = 3.05 ; N.S.
- Rp2 : H = 16.74 ; p = .005
- Rp3 : H = 20.26 ; p = .0011
- TOTRp : H = 16.86 ; p = .0048
- R+Rp1 : H = 4.43 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 25.33 ; p = .0001
- R+Rp3 : H = 19.30 ; p = .0017
- TOTRR : H = 23.91 ; p = .0002
- DEF1 : H = 4.46 ; N.S.
- DEF2 : H = 3.26 ; N.S.
- DEF3 : H = 0.93 ; N.S.
- TOTDEF : H = 2.00 ; N.S.
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 4.77 ; N.S.
- TOIL3 : H = 4.23 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 4.31 ; N.S.
- LAT M1 : H = 9.55 ; N.S.
- LAT M5 : H = 6.61 ; N.S.

Le lot contrôle montre, par rapport au lot témoin, une augmentation du nombre de marches montées et de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air, pendant la deuxième mn du test (Tableau 60). Le cumul des 2

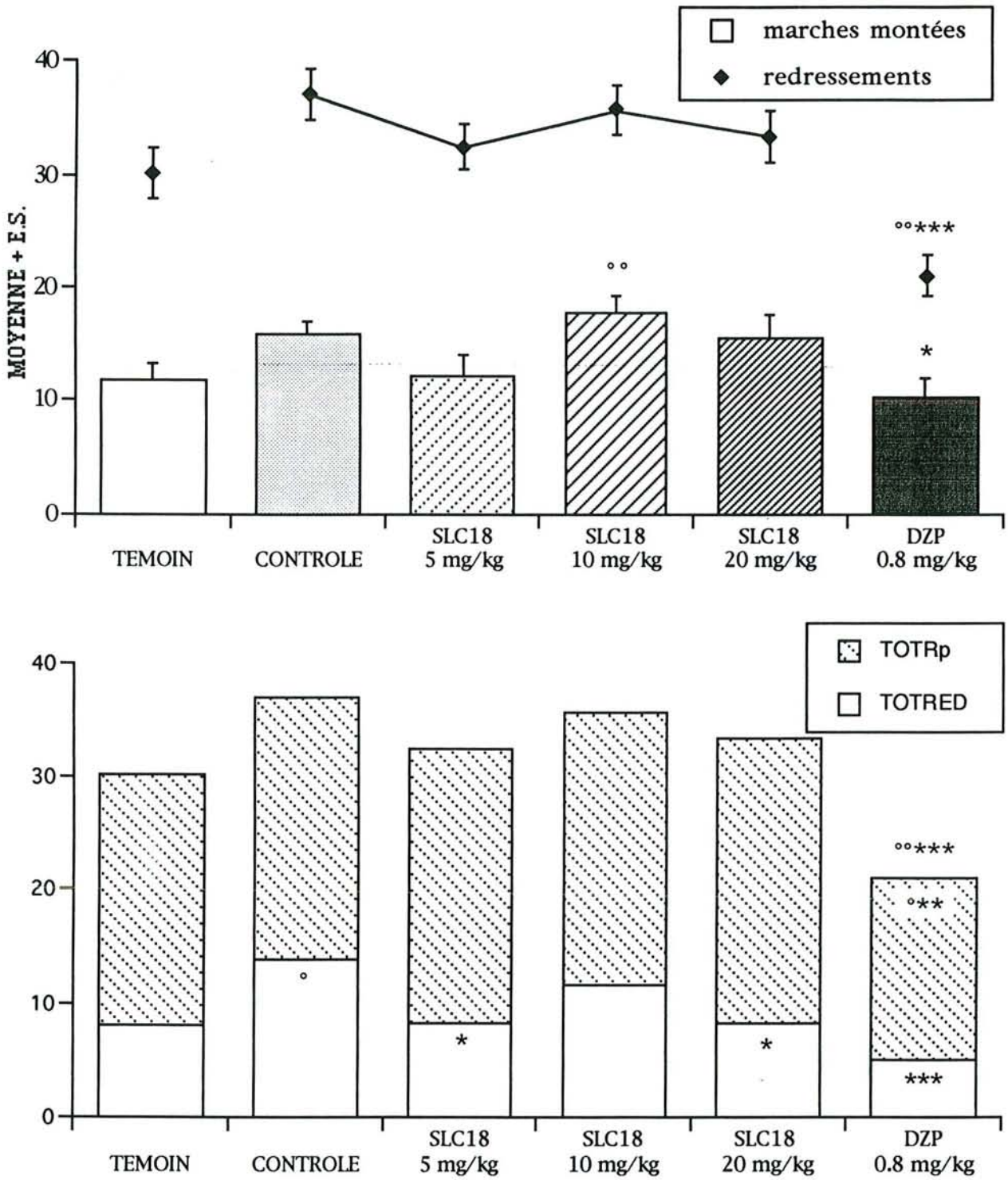


Figure 88: Expérience n°8D: Effets du SLC18 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

types de redressements est également supérieur dans le lot contrôle, pendant la deuxième mn. Enfin, le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air pendant le test est augmenté d'une manière statistiquement significative dans le lot traité avec le véhicule, par rapport aux témoins. Toutes ces différences vont dans le sens d'une augmentation, il ne s'agit donc pas d'effets secondaires ataxiques liés au véhicule d'injection, pouvant interférer avec les activités du SLC18 ou du DZP.

Contrairement aux résultats des expériences précédentes, le DZP diminue significativement le nombre de marches montées pendant la deuxième mn du test et pendant la durée totale du test, par rapport au lot contrôle (Figure 88). Le SLC18 ne modifie pas ce paramètre de façon statistiquement significative par rapport au lot contrôle, mais tend à augmenter le nombre de marches montées avec la dose de 10 mg/kg, significativement par rapport au lot témoin. Le nombre de marches descendues n'est pas modifié du point de vue statistique.

Le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air diminue significativement, par rapport au lot contrôle, dans les lots traités avec 5 ou 20 mg de SLC18 par kg et dans le lot traité avec le DZP (Figure 88). La dose de 10 mg de SLC18 par kg diminue également ce paramètre, mais à un degré moindre que les doses 5 et 20 mg/kg et sans atteindre le seuil de significativité. La diminution induite par le DZP est plus importante que celle provoquée par les 3 doses de SLC18, mais la différence n'est significative qu'entre le DZP et le SLC18 à 10 mg/kg (Tableau 60). Par contre, le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif pendant le test n'est modifié significativement que par le DZP (Figure 88). Les valeurs observées pour ce paramètre avec le SLC18 sont comparables aux contrôles. La comparaison DZP/SLC18 montre d'ailleurs une différence statistiquement significative pour le nombre de redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif pendant la deuxième et la troisième mn du test et pendant la durée totale du test. Il en est de même pour le cumul des 2 types de redressements. La seule diminution statastiquement significative par rapport au lot contrôle est obtenue avec le DZP. Les autres paramètres (défécations, toilettages et latences de montée des marches) ne présentent pas de différences significatives du point de vue statistique entre les lots (Tableau 60).

Donc, le DZP, à la dose testée, diminue les 2 types de redressements, alors que le SLC18 diminue uniquement le nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, cette diminution étant significative aux doses 5 et 20 mg/kg.

Contrairement aux expériences précédentes, le DZP diminue à la fois l'activité locomotrice et le nombre de redressements, à la dose de 0.8 mg/kg. Donc, il semblerait que les conditions expérimentales journalières ne permettaient pas la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique. Cependant, le lot contrôle de cette expérience montre un nombre de marches montées particulièrement élevé par rapport aux témoins, élevé également par rapport aux lots contrôles des autres expériences réalisées dans les mêmes conditions. Le nombre total de marches montées dans le lot traité avec le DZP est d'ailleurs comparable à celui du lot témoin du point de vue statistique et à celui relevé dans les expériences n°4D, 5D, 6D et 9D avec le même traitement. Par contre, dans l'expérience présente, la diminution, par le DZP, du nombre total de redressements effectués est significative à la fois par rapport au lot contrôle et par rapport au lot témoin. Les deux paramètres, marches montées et redressements, ne sont donc pas affectés avec la même intensité par le DZP. On peut donc parler d'activité de type anxiolytique dans le lot traité avec le DZP.

Le SLC18 ne diminue significativement ni le nombre de marches montées, ni le nombre total de redressements effectués et ne montre donc pas d'effets comparables à celui du DZP. Il produit toutefois une diminution de l'un des 2 types de redressements ne s'accompagnant pas d'une diminution du nombre de marches montées. Si les problèmes de solubilité du SLC dans les solvants ne l'avaient pas empêché, il aurait été intéressant de tester des dosages plus importants.

I. Expérience n°9D : Effets du SLC19 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 75 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;
  * Lots traités avec le SLC19 : 5 mg/kg (N = 12) ;
    10 mg/kg (N = 14) ;
    20 mg/kg (N = 13), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC19 5 mg/kg		SLC19 10 mg/kg		SLC19 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	4,1	0,8	2,4	0,6	3,6	0,4	3,4	0,7	3,7	0,6	2,9	0,5
ASC2	5,7	0,5	4,0	0,9	7,2 *a	0,8	4,7	0,5	3,0 °b	0,8	4,6	0,9
ASC3	5,4	0,9	4,3	0,8	6,0	1,2	6,0	0,8	4,6	0,9	3,0	0,7
TOTASC	15,2	1,8	10,7	1,8	16,8 a	1,9	14,1 a	1,4	11,3 b	1,6	10,5	1,4
DESC1	1,3	0,6	1,2	0,3	1,3	0,5	1,4	0,4	0,7	0,2	2,1	0,5
DESC2	6,2	1,0	3,6	0,8	6,3	0,9	4,8	0,7	4,2	0,9	4,2	0,6
DESC3	6,3	0,9	3,0 °	0,7	6,5 **a	0,7	4,6 b	0,6	3,9	1,1	3,5 °	0,7
TOTDESC	13,8	1,7	7,8 °	1,6	14,1 *	1,7	10,9	1,2	8,8 b	1,9	9,8	1,4
MARCHES TOT	29,0	3,4	18,4	3,4	30,8 *a	3,5	24,9	2,5	20,1 b	3,4	20,3	2,8
RED1	0,7	0,3	0,7	0,3	0,8	0,4	0,6	0,2	0,4	0,2	0,2	0,1
RED2	2,4	0,7	3,5	0,7	3,2	0,6	2,5	0,5	1,4	0,4	1,4	0,4
RED3	4,2	0,5	4,6	0,9	4,3 a	0,7	4,1 a	0,6	2,5 °	0,8	1,8 °°*	0,5
TOTRED	7,3	1,1	8,8	1,3	8,3 a	1,1	7,2 a	1,0	4,3 °*b	0,9	3,4 °**	0,8
Rp1	7,0	0,7	7,0	0,8	8,0	0,7	5,9	0,7	6,2	0,8	5,4	0,7
Rp2	5,8	0,8	7,4	0,9	7,2	0,6	7,0	0,8	5,2	0,7	5,0	0,7
Rp3	7,3	0,5	6,8	1,0	5,6 °a	0,7	5,6 °a	0,6	4,8 °	0,8	3,5 °°°*	0,5
TOTRp	20,1	1,4	21,2	2,2	20,8 a	1,2	18,4	1,3	16,2 b	1,6	13,9 °°*	1,3
R+Rp1	7,7	0,7	7,7	0,8	8,8	0,7	6,5	0,8	6,6	0,8	5,6	0,6
R+Rp2	8,3	1,1	10,9	1,1	10,3 a	0,8	9,5 a	1,0	6,6 *bc	0,9	6,4 **	0,9
R+Rp3	11,4	0,7	11,3	1,5	9,8 a	1,2	9,6 a	0,7	7,3 °	1,3	5,3 °°°***	0,8
TOTRR	27,3	1,6	29,9	3,0	29,0 a	1,5	25,6 a	1,8	20,5 b	2,4	17,3 °°**	1,9
DEF1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DEF2	0,0	0,0	0,4	0,2	0,0	0,0	0,2	0,2	0,0	0,0	0,3	0,2
DEF3	0,4	0,3	1,0	0,4	0,3	0,3	0,5	0,3	0,2	0,2	0,3	0,3
TOTDEF	0,6	0,4	1,4	0,6	0,3	0,3	0,7	0,4	0,2	0,2	0,5	0,3
TOIL1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0
TOIL3	0,5	0,2	0,2	0,1	0,3	0,2	0,4	0,1	0,7	0,3	0,4	0,1
TOTTOIL	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,1	0,8	0,3	0,4	0,1
LAT M1	29,8	6,7	53,3	17,1	25,9	3,7	35,7	7,9	28,4	2,2	37,8	13,5
LAT M5	82,7	14,1	132,0	16,6	80,0	10,7	94,0	14,6	94,5	14,7	117,4	18,2

Tableau 61: Expérience n°9D: Effets du SLC19 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$, °°°: $p < .001$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; a: $p < .05$ par rapport au DZP; b: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg; c: $p < .05$ par rapport à 10 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 10 à 14 par lot.

2. Résultats

Le SLC19 n'est différent du SLC13 que par la présence d'un noyau benzyl protégeant la molécule de GABA. Comme dans le cas du SLC13, le SLC19 a causé des décès aux doses testées :

- 0 morts sur 12 rats avec 5 mg/kg ;
- 0 morts sur 14 rats avec 10 mg/kg ;
- 3 morts sur 13 rats avec 20 mg/kg : les 3 décès sont survenus 6, 7 et 19 mn après le traitement.

Un calcul de la dose létale 50 du SLC19 a été réalisé d'après la méthode de Berkson (1953) : $DL_{50} = 44.1 \pm 5.6$.

Etant donnée la forte toxicité du SLC13 et du SLC19, et l'absence de toxicité du SLC18 comportant le même transporteur que le SLC13 et le SLC19 mais contenant une molécule de nipécotate à la place du GABA, on constate que le transporteur de type mixte n'est toxique que lorsqu'il est couplé à une molécule de GABA et ceci même si un noyau benzyl est fixé sur le GABA (ce qui est le cas pour le SLC19). Par contre, lorsqu'il est couplé à une molécule de nipécotate (SLC18), ce transporteur n'est pas toxique aux doses testées.

L'effectif total passe donc de 75 à 72 pour les données comportementales, puisque 3 rats sont décédés avant le test. Les résultats recueillis sont reportés dans le Tableau 61 et l'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 72) :

- ASC1 : H = 4.29 ; N.S.
- ASC2 : H = 11.17 ; p = .0481
- ASC3 : H = 9.26 ; N.S.
- TOTASC : H = 11.07 ; p = .05
- DESC1 : H = 4.05 ; N.S.
- DESC2 : H = 7.25 ; N.S.
- DESC3 : H = 14.87 ; p = .0109
- TOTDESC : H = 12.03 ; p = .0344
- MARCHES TOT : H = 11.13 ; p = .0488
- RED1 : H = 3.73 ; N.S.
- RED2 : H = 10.52 ; N.S.
- RED3 : H = 12.60 ; p = .0274
- TOTRED : H = 17.74 ; p = .0033
- Rp1 : H = 7.53 ; N.S.
- Rp2 : H = 7.84 ; N.S.
- Rp3 : H = 16.90 ; p = .0047
- TOTRp : H = 14.23 ; p = .0142
- R+Rp1 : H = 10.42 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 15.45 ; p = .0086
- R+Rp3 : H = 21.80 ; p = .0006
- TOTRR : H = 20.69 ; p = .0009
- DEF1 : H = 5.00 ; N.S.
- DEF2 : H = 8.21 ; N.S.
- DEF3 : H = 6.58 ; N.S.
- TOTDEF : H = 5.22 ; N.S.
- TOIL1 : H = 0.00 ; N.S.
- TOIL2 : H = 3.86 ; N.S.
- TOIL3 : H = 4.28 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 1.91 ; N.S.
- LAT M1 : H = 1.58 ; N.S.
- LAT M5 : H = 7.07 ; N.S.

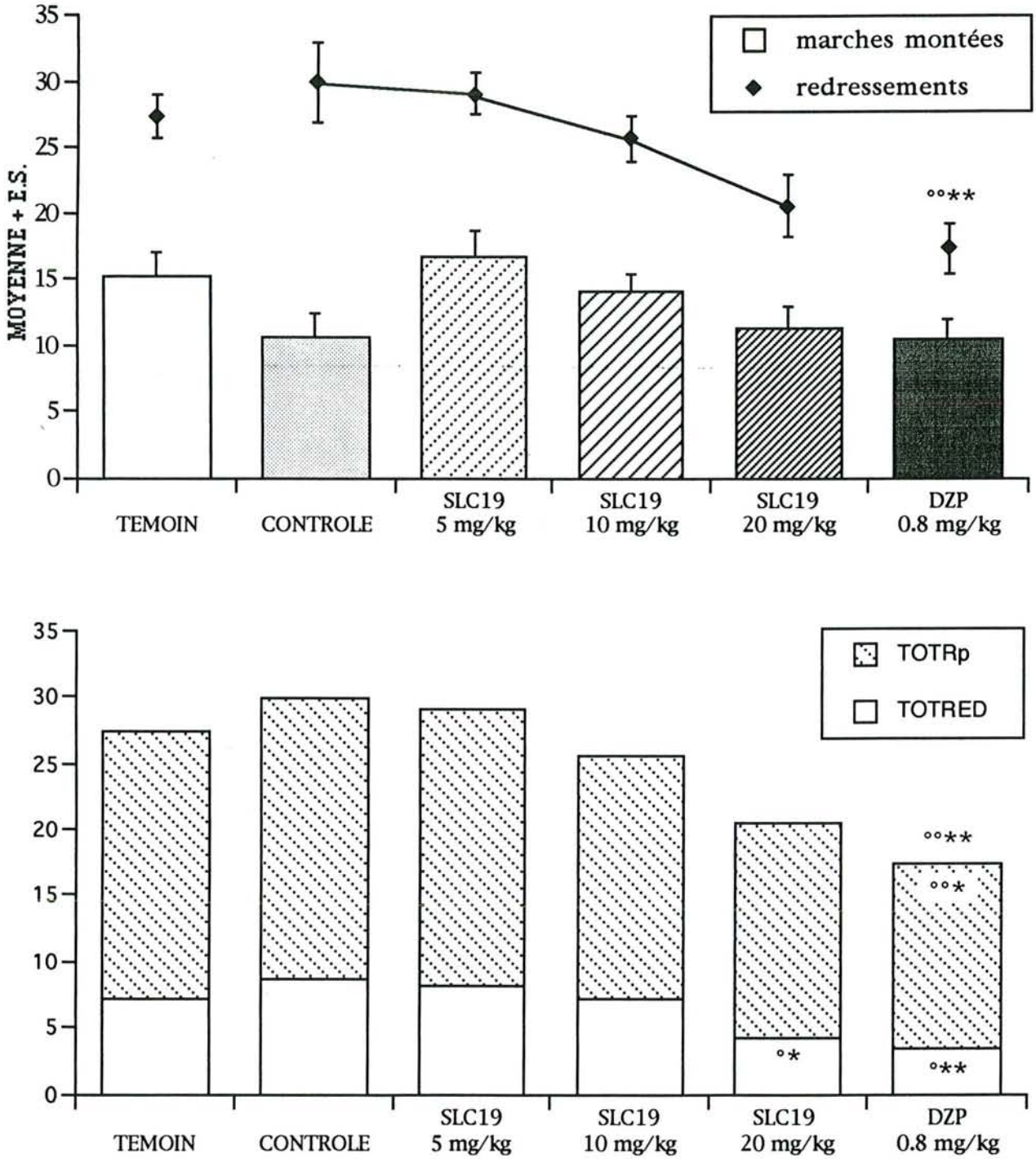


Figure 89: Expérience n°9D: Effets du SLC19 (5-20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

Dans cette expérience, le véhicule d'injection affecte le nombre de marches descendues pendant la troisième mn du test et pendant la durée totale du test (Tableau 61). Le nombre de marches descendues pendant ces intervalles est significativement diminué par rapport au lot témoin. Par contre, les autres paramètres pris en compte, y compris le nombre de marches montées, ne sont pas modifiés du point de vue statistique par rapport aux témoins. Par conséquent, dans cette expérience, l'emploi de ce véhicule pour l'administration de SLC19 ou de DZP ne présente pas d'inconvénient majeur.

Le DZP n'affecte pas significativement le nombre de marches montées ou descendues par rapport au lot contrôle (Tableau 61). Par contre, le SLC19 augmente le nombre de marches montées pendant la deuxième mn du test par rapport aux contrôles, à la dose de 5 mg/kg. En augmentant la dose, on observe une diminution dose-dépendante du nombre de marches montées pendant la deuxième mn avec le SLC19, qui ramène ce paramètre au niveau des contrôles avec 20 mg/kg. Le nombre total de marches montées suit la même évolution, mais aucune des 3 doses ne provoque de modification significative par rapport au lot contrôle (Figure 89). Le nombre total de marches descendues, par contre, montre une augmentation statistiquement significative avec 5 mg de SLC19 par kg. Le nombre total de marches montées et descendues pendant le test est également significativement plus élevé dans le lot traité avec 5 mg de SLC19 par kg que dans le lot contrôle. Les redressements avec les pattes antérieures en l'air sont diminués d'une manière statistiquement significative par le DZP. Le SLC19 provoque une diminution dose-dépendante de ces redressements, atteignant le seuil de significativité à 20 mg/kg (Figure 89). Les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, par contre ne sont significativement modifiés que par le DZP. Le SLC19 induit une diminution dose-dépendante de ces redressements, mais cette diminution n'est pas significative du point de vue statistique. De même, le cumul des 2 types de redressements n'est significativement diminué que par le DZP. Pendant la deuxième mn toutefois, cette diminution dose-dépendante atteint un niveau significatif avec 20 mg/kg. Les autres paramètres observés (défécations, toilettages et latence de montée des marches 1 et 5) ne sont pas modifiés du point de vue statistique par les traitements.

En conclusion de cette expérience, nous pouvons dire que les conditions expérimentales journalières permettaient la mise en évidence d'un effet de type anxiolytique, étant donné que le lot traité par le DZP présente une diminution du nombre de redressements à une dose ne modifiant pas l'activité locomotrice. Nous observons un effet proche de celui du DZP avec le SLC19 à la dose de 20 mg/kg. En comparant les lots traités avec 20 mg de SLC19 par kg ou 0.8 mg de DZP par kg, aucune

différence statistiquement significative n'est relevée (Tableau 61). La diminution des redressements totaux n'est toutefois pas significative du point de vue statistique par rapport au lot contrôle, avec le SLC19. Il n'est pas possible d'augmenter les dosages, en raison de l'apparition d'une toxicité à partir de 20 mg/kg. Les 2 paramètres, marches montées et redressements, diminuent parallèlement avec l'augmentation de la dose de SLC19. Rappelons que le SLC19 et le SLC13 ne diffèrent que par la fixation d'un noyau benzyl sur la molécule de GABA dans le cas du SLC19. Les résultats obtenus avec ces 2 SLC ne sont pas comparables. Le SLC13 montrait un profil de type anxiolytique de 2.5 à 10 mg/kg (expérience n°4D). Donc, l'adjonction d'un noyau benzyl sur le GABA a diminué les effets toxiques de la molécule mais a également diminué les effets de type anxiolytique. Le SLC19 provoque cependant, des effets comparables à ceux du DZP à la dose de 20 mg/kg.

J. Expérience n°10D : Effets du SLC13 (2.5-10 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8-1.6 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 79 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 120 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;
  * Lots traités avec le SLC13 : 2.5 mg/kg (N = 11) ;
    5 mg/kg (N = 12) ;
    10 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 11) ;
    1.6 mg/kg (N = 11), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Dans la première série d'expériences concernant les SLC13, 14 et 15 (expériences n°1D à 6D), les tests ont été réalisés 1 h après le traitement. Leurs effets étaient comparés à ceux du DZP en solution dans le même véhicule, à la dose de 0.8 mg/kg. Un profil de type anxiolytique a été observé avec le SLC13 aux doses 2.5 à 10

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC13 2.5 mg/kg		SLC13 5 mg/kg		SLC13 10 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg		DZP 1.6 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	5,0	0,4	4,3	0,4	4,8	1,0	2,7 °°*a	0,6	5,2 d	0,9	6,8 °**	0,7	4,5 a	0,7
ASC2	5,5	0,8	5,2	0,6	6,0	1,0	4,4	0,7	6,0	1,2	7,2	0,6	5,3	0,8
ASC3	7,2	0,5	8,1	0,8	7,9	0,9	5,4	0,6	6,0	1,5	7,1	1,3	6,5	1,0
TOTASC	17,7	1,1	17,6	1,1	18,7	2,5	12,5 °°**abc	1,1	17,2 d	3,1	21,1	2,1	16,2	1,4
DESC1	3,0	0,5	1,7	0,6	2,4	0,6	2,1	0,5	3,8	1,0	3,7	0,8	2,2	0,6
DESC2	5,6	0,5	5,4	0,7	6,5	1,1	3,4 °*ac	0,6	5,4	1,2	8,4 °*	1,0	4,9 a	0,9
DESC3	6,3	0,6	7,4	0,6	6,7	1,0	4,7	0,6	6,3	1,3	6,5	1,3	6,9	1,0
TOTDESC	14,9	1,1	14,5	1,0	15,6	2,3	10,2 °*ac	1,2	15,6 d	2,7	18,5	2,3	14,0	1,4
MARCHES TOT	32,6	2,1	32,1	2,0	34,4	4,8	22,7 °°**abc	2,2	32,8 d	5,7	39,6	4,3	30,2	2,7
RED1	2,3	0,5	1,2	0,4	1,2 a	0,5	1,5 a	0,5	0,8 °a	0,4	3,2 **	0,5	1,9	0,7
RED2	4,5	0,7	3,1	0,6	5,6	0,7	4,7	0,9	3,2	0,8	4,1	0,6	3,5	0,6
RED3	6,0	0,8	4,8	0,7	4,3	0,9	3,3	0,7	3,7	1,2	5,3	0,5	4,9	1,2
TOTRED	12,8	1,5	9,1	1,2	11,1	1,7	9,5	1,7	7,7	1,9	12,5	1,0	10,4	2,2
Rp1	9,6	0,8	9,0	0,6	8,5	1,2	8,3	0,7	7,6	0,9	8,3	0,7	7,4	0,5
Rp2	6,0	0,4	6,7	0,9	5,5	0,7	6,2	0,7	5,4	0,8	5,4	0,8	4,6	0,6
Rp3	6,6	0,6	7,2	0,7	7,4	0,6	6,6	0,6	5,1	1,2	5,4	0,5	4,9	0,6
TOTRp	22,2	1,4	22,8	1,6	21,4	1,7	21,1	1,3	18,1	2,4	19,0	1,1	16,9	0,9
R+Rp1	11,8	0,8	10,2	0,8	9,6	1,3	9,8	0,7	8,3	0,8	11,5	0,7	9,3	0,8
R+Rp2	10,5	0,8	9,8	0,9	11,2	1,1	10,8	0,9	8,7	1,2	9,5	0,8	8,2	0,7
R+Rp3	12,6	0,8	12,0	0,9	11,6	1,0	9,9	0,9	8,8	2,1	10,6	0,8	9,8	1,4
TOTRR	34,9	1,4	31,9	1,8	32,5	2,5	30,6	2,3	25,8	3,9	31,5	1,7	27,3	2,3
DEF1	1,0	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2	0,8	0,3	0,1	0,1	1,3	0,5	0,5	0,3
DEF2	1,0	0,4	0,3	0,3	0,5	0,4	1,3	0,5	0,4	0,4	0,3	0,2	0,1	0,1
DEF3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,4	0,3	0,3	0,1	0,1	0,6	0,5	0,5	0,3
TOTDEF	2,3	0,8	0,8	0,7	1,4	0,7	2,4	0,7	0,7	0,6	2,2	0,6	1,2	0,3
TOIL1	0,2	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,2
TOIL2	0,4	0,1	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2
TOIL3	0,5	0,2	1,1	0,3	0,5	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,5	0,2	0,6	0,2
TOTTOIL	1,1	0,2	1,4	0,3	0,6	0,2	0,8	0,2	0,8	0,4	0,9	0,3	1,2	0,2
LAT M1	16,0	2,3	24,1	2,8	34,4	12,0	34,1	10,2	19,9	4,3	14,4	2,7	16,1	2,1
LAT M5	95,3	16,3	92,3	15,6	98,3	20,6	125,7	14,7	87,9	20,6	70,5	16,5	66,2	8,5

Tableau 62: Expérience n°10D: Effets du SLC13 (2.5-10 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8-1.6 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP 0.8 mg/kg; **b**: $p < .05$ par rapport au DZP 1.6 mg/kg; **c**: $p < .05$ par rapport à 2.5 mg/kg; **d**: $p < .05$ par rapport à 5 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 10 à 12 par lot.

mg/kg. Par contre, le SLC14 et le SLC15 n'ont pas montré une activité de type anxiolytique significative aux doses testées. Ces 3 SLC ont été réévalués dans les mêmes conditions, mais avec une durée de 2 h entre le traitement et le test (expériences n°10D à 12D). Dans l'expérience présente, un lot traité avec 1.6 mg de DZP par kg a été rajouté, en plus du lot traité avec 0.8 mg/kg, afin de réaliser une courbe dose-réponse du DZP, 2 h après l'administration.

Comme dans les expériences précédentes concernant le SLC13, des effets toxiques sont apparus mais uniquement à la plus forte dose testée : 2 rats sur 10 sont décédés après une dose de 10 mg/kg, le premier 10 mn après l'administration, le deuxième pendant la nuit suivant l'expérience, soit plus de 4 h après l'injection.

L'effectif total passe donc de 79 à 78 pour les données comportementales, puisque le premier rat est décédé avant le test et que le deuxième rat est décédé plus de 4 h après le test. Les résultats recueillis sont reportés dans le Tableau 62 et l'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 6, N = 78) :

- ASC1 : H = 16.74 ; p = .0103
- ASC2 : H = 8.34 ; N.S.
- ASC3 : H = 7.99 ; N.S.
- TOTASC : H = 13.68 ; p = .0334
- DESC1 : H = 8.13 ; N.S.
- DESC2 : H = 16.64 ; p = .0107
- DESC3 : H = 7.88 ; N.S.
- TOTDESC : H = 12.90 ; p = .0446
- MARCHES TOT : H = 14.83 ; p = .0216
- RED1 : H = 14.08 ; p = .0287
- RED2 : H = 8.35 ; N.S.
- RED3 : H = 9.63 ; N.S.
- TOTRED : H = 8.52 ; N.S.
- Rp1 : H = 6.64 ; N.S.
- Rp2 : H = 5.40 ; N.S.
- Rp3 : H = 12.32 ; N.S.
- TOTRp : H = 12.06 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 11.07 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 6.78 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 6.05 ; N.S.
- TOTRR : H = 8.73 ; N.S.
- DEF1 : H = 8.31 ; N.S.
- DEF2 : H = 9.74 ; N.S.
- DEF3 : H = 3.81 ; N.S.
- TOTDEF : H = 8.69 ; N.S.
- TOIL1 : H = 4.86 ; N.S.
- TOIL2 : H = 2.75 ; N.S.
- TOIL3 : H = 6.13 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 7.20 ; N.S.
- LAT M1 : H = 8.10 ; N.S.
- LAT M5 : H = 8.15 ; N.S.

Les lots témoin et contrôle ne montrent aucune différence significative. L'absence d'effet du véhicule d'injection est donc vérifiée.

Le DZP augmente le nombre de marches montées pendant la première mn du test par rapport aux lots témoin et contrôle à la dose de 0.8 mg/kg (Tableau 62). Le nombre total de marches montées n'est cependant pas modifié significativement par le DZP aux 2 doses testées (Figure 90). A la plus faible dose, le DZP augmente également le nombre de marches descendues pendant la deuxième mn du test, par

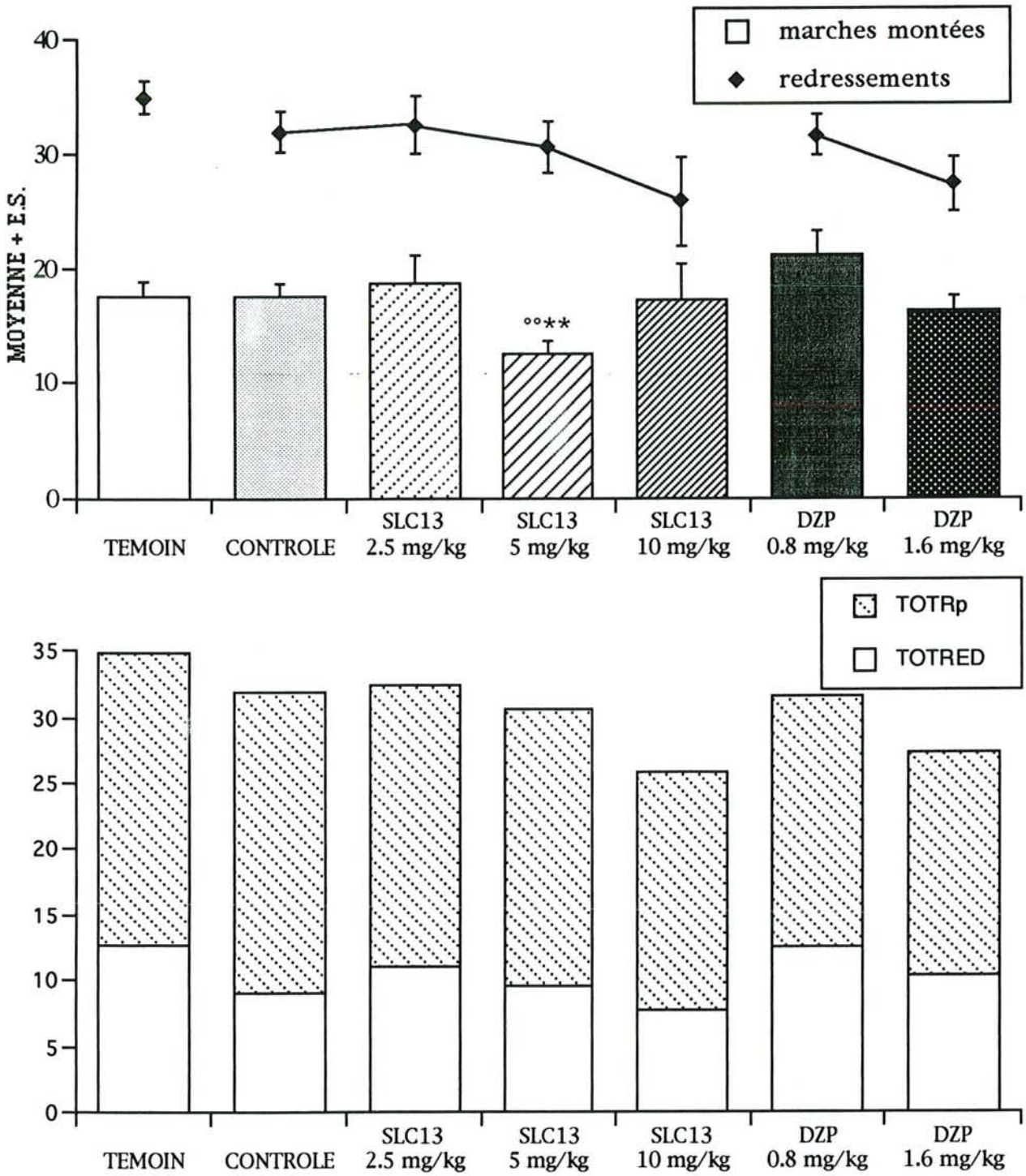


Figure 90: Expérience n°10D: Effets du SLC13 (2.5-10 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8-1.6 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

rapport aux lots témoin et contrôle et le nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air par rapport au lot contrôle. Le cumul des 2 types de redressements n'est pas modifié du point de vue statistique par le DZP mais diminue d'une manière dose-dépendante (Figure 90). Il ne provoque plus aucun changement significatif avec 1.6 mg/kg. En dehors d'une légère augmentation de l'activité locomotrice, le DZP ne produit plus d'effet de type anxiolytique mesurable, avec 0.8 mg/kg, contrairement aux observations réalisées 1 h après le traitement. Le fait de doubler la dose administrée ne suffit pas à rétablir cette activité, au bout de 2 h.

En ce qui concerne le SLC13, il diminue significativement le nombre de marches montées pendant la première mn du test et pendant la durée totale du test à la dose de 5 mg/kg. Par contre, les doses inférieure et supérieure ne modifient pas ce paramètre d'une manière significative par rapport au lot contrôle. Le nombre de marches montées pendant la première mn du test et pendant la durée totale du test, dans les lots traités avec 2.5 ou 10 mg de SLC13 par kg est significativement différent de celui du lot traité avec 5 mg/kg (Tableau 62). Cet effet n'est donc pas dose-dépendant. A la dose de 5 mg/kg, le SLC13 diminue également le nombre de marches descendues pendant la deuxième mn et pendant la durée totale du test, ainsi que le nombre total de marches montées ou descendues pendant le test. Comme le montre la Figure 90, il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les différents lots pour les 2 types de redressements, cumulés ou non. On observe tout de même, dans les lots traités avec le SLC13, une diminution dose-dépendante mais non significative du nombre total de redressements effectués et ce paramètre n'évolue pas dans le même sens que les marches montées (Figure 90).

Donc, le SLC 13 et le DZP ne présentent plus d'effet de type anxiolytique aux doses testées lorsque l'injection i.v. est réalisée 2 h avant le test. On observe uniquement une diminution statistiquement significative de l'activité locomotrice avec 5 mg de SLC13 par kg. Il est impossible d'augmenter la dose de SLC13 injectée, en raison de la toxicité importante de cette molécule.

Si l'on compare les données des lots ayant reçu les mêmes traitements dans les expériences n°4D et n°10D, c'est-à-dire avec 1 et 2 h de latence entre le traitement et le test respectivement, on constate des différences entre les 2 lots témoins. Les 2 lots contrôles montrent moins de différences. Il n'est pas possible de comparer les 2 expériences avec un test statistique mais on peut remarquer que les rats traités avec le SLC13 montraient une diminution du nombre total de redressements effectués par rapport aux contrôles avec 2.5, 5 et 10 mg/kg, 1 h après le traitement. 2 h après le traitement le SLC13 a toujours tendance à diminuer le nombre de redressements, mais d'une manière non significative et il diminue le nombre de marches montées avec 5 mg/kg.

En conclusion, l'effet de type anxiolytique du DZP obtenu 1 h après le traitement à la dose de 0.8 mg/kg a disparu au bout de 2 h. Et, même en doublant cette dose, nous n'avons pas obtenu d'activité 2 h après le traitement. Augmenter encore la dose entrainerait l'apparition d'effets secondaires indésirables. Il semble donc que 2 h après un traitement par voie i.v., il soit difficile d'obtenir un profil de type anxiolytique avec le DZP dans les conditions expérimentales employées. En ce qui concerne le SLC13, l'effet anxiolytique observé 1 h après le traitement, aux doses 2.5, 5 et 10 mg/kg, a disparu 2 h après le traitement. La mortalité devenant très importante à des doses plus élevées, il n'est pas possible d'augmenter les dosages. L'administration i.v. du SLC13 (2.5-10 mg/kg) ou du DZP (0.8-1.6 mg/kg) permet donc de mettre en évicence un effet de type anxiolytique pendant une durée inférieure à 2h.

K. Expérience n°11D : Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 73 rats mâles Wistar de 150-190 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.
- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 120 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 13) ;
  * Lots traités avec le SLC14 : 5 mg/kg (N = 11) ;
    10 mg/kg (N = 12) ;
    20 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 13), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Comme dans les expériences précédentes concernant le SLC14, aucune toxicité n'a été détectée aux doses testées. Les résultats recueillis sont reportés dans le Tableau 63 et l'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 73) :

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC14 5 mg/kg		SLC14 10 mg/kg		SLC14 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	4,3	0,8	3,2	0,4	5,4	1,1	5,3	0,7	3,4	0,8	5,0	0,8
ASC2	5,8	0,7	5,3	0,9	5,7	1,1	7,8	0,8	5,8	0,9	6,9	1,0
ASC3	6,3	0,8	5,5	0,9	7,0	0,9	7,4	0,5	7,8	0,8	6,5	0,6
TOTASC	16,3	1,9	13,9	1,7	18,1	2,5	20,6	1,3	17,1	2,0	18,5	1,9
DESC1	2,5	0,7	1,6	0,4	2,8	0,8	2,8	0,5	2,6	0,7	3,8	0,8
DESC2	5,6	0,8	4,9	0,8	5,9	1,1	7,5	0,6	4,4	0,8	6,5	0,9
DESC3	7,3	0,9	4,8	0,7	7,8	0,9	8,3	0,7	6,9	1,0	6,6	0,6
TOTDESC	15,3	1,8	11,3	1,5	16,5	2,4	18,7 ***	0,9	13,9	1,9	17,0 *	1,8
MARCHES TOT	31,7	3,6	25,2	3,1	34,6	4,8	39,3	2,1	31,0	3,9	35,5	3,6
RED1	2,4	0,3	2,5	0,4	1,8	0,6	2,6	0,6	1,6	0,5	2,0	0,4
RED2	6,2	0,8	6,2	0,9	6,6	1,2	5,1	0,7	6,3	0,9	6,8	1,0
RED3	7,0	1,0	7,5	0,9	7,1	0,9	7,2	0,7	5,8	0,9	5,2	0,6
TOTRED	15,6	1,4	16,2	1,1	15,5	1,3	14,8	1,5	13,6	1,9	14,0	1,5
Rp1	9,1	0,7	10,2	0,6	8,7	1,0	8,8	0,7	7,6	0,6	8,2	0,4
Rp2	5,6	0,7	6,8	0,5	6,9	0,6	6,9	0,9	7,0	0,8	6,6	0,5
Rp3	7,8	0,6	6,7	0,7	7,4	0,9	7,4	0,6	6,3	0,5	5,1	0,8
TOTRp	22,4	1,7	23,7	1,2	23,0	1,5	23,1	1,8	20,9	1,2	19,9	1,4
R+Rp1	11,5	0,7	12,7	0,8	10,5	1,2	11,3	0,8	9,2	0,9	10,2	0,5
R+Rp2	11,8	1,0	13,1	0,7	13,5	1,3	12,0	1,0	13,3	1,4	13,5	1,2
R+Rp3	14,8	1,2	14,2	1,3	14,5 a	1,2	14,6 a	1,1	12,1	0,9	10,2 °**	0,8
TOTRR	38,0	2,3	39,9	1,8	38,5	2,0	37,9	2,5	34,5	2,6	33,9	2,3
DEF1	0,8	0,4	0,5	0,2	0,4	0,4	0,3	0,1	0,7	0,3	0,7	0,3
DEF2	0,5	0,3	0,8	0,4	0,8	0,4	0,4	0,3	1,2	0,4	0,7	0,4
DEF3	1,0	0,4	1,2	0,6	0,7	0,4	0,5	0,3	0,8	0,4	0,9	0,3
TOTDEF	2,3	0,9	2,5	0,8	1,9	0,8	1,2	0,6	2,7	0,8	2,3	0,7
TOIL1	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
TOIL2	1,0	0,4	0,8	0,2	0,3	0,2	0,3	0,1	0,4	0,3	0,2	0,2
TOIL3	0,5	0,2	0,8	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,6	0,2	0,8	0,2
TOTTOIL	1,6	0,3	1,6	0,2	0,6 °**	0,2	0,8 *	0,3	1,0	0,3	1,0	0,3
LAT M1	20,1	5,1	31,3	5,0	19,4	5,3	19,8	4,7	34,5	8,4	14,5	3,2
LAT M5	89,2	16,5	136,1	11,5	89,5	19,0	68,2	13,1	106,9	17,4	76,8	17,2

Tableau 63: Expérience n°11D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$, ***: $p < .001$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP (test de Mann-Whitney). N = 11 à 13 par lot.

- ASC1 : H = 7.38 ; N.S.
- ASC2 : H = 7.14 ; N.S.
- ASC3 : H = 3.97 ; N.S.
- TOTASC : H = 7.57 ; N.S.
- DESC1 : H = 4.90 ; N.S.
- DESC2 : H = 8.41 ; N.S.
- DESC3 : H = 10.73 ; N.S.
- TOTDESC : H = 12.24 ; p = .0316
- MARCHES TOT : H = 10.05 ; N.S.
- RED1 : H = 5.91 ; N.S.
- RED2 : H = 1.88 ; N.S.
- RED3 : H = 6.85 ; N.S.
- TOTRED : H = 3.70 ; N.S.
- Rp1 : H = 8.12 ; N.S.
- Rp2 : H = 2.77 ; N.S.
- Rp3 : H = 8.74 ; N.S.
- TOTRp : H = 5.49 ; N.S.
- R+Rp1 : H = 10.03 ; N.S.
- R+Rp2 : H = 1.94 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 14.54 ; p = .0125
- TOTRR : H = 5.99 ; N.S.
- DEF1 : H = 3.11 ; N.S.
- DEF2 : H = 3.43 ; N.S.
- DEF3 : H = 1.92 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.33 ; N.S.
- TOIL1 : H = 7.34 ; N.S.
- TOIL2 : H = 9.10 ; N.S.
- TOIL3 : H = 5.29 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 11.22 ; p = .0471
- LAT M1 : H = 8.36 ; N.S.
- LAT M5 : H = 11.00 ; N.S.

Dans l'ensemble, très peu de paramètres sont affectés significativement par les différents traitements. Les lots témoin et contrôle ne présentent aucune différence statistiquement significative (Tableau 63). Ainsi, comme dans l'expérience précédente, le véhicule d'injection n'affecte pas le comportement des animaux dans ls conditions de l'expérience.

Le DZP et le SLC14 augmentent le nombre total de marches montées par rapport au lot contrôle, mais cette augmentation n'est pas significative du point de vue statistique (Figure 91). Le nombre total de marches descendues est également augmenté par les 2 substances, par rapport aux contrôles. Mais dans ce cas, l'augmentation est significative pour les lots traités avec 10 mg de SLC14 par kg ou avec le DZP (Tableau 63). Le SLC14 et le DZP n'affectent pas significativement le nombre de redressements effectués avec les pattes antérieures en l'air, mais ceux-ci ont tendance à diminuer avec les 2 substances (Figure 91). Les redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif tendent également à diminuer avec le SLC14 et le DZP, sans atteindre, là encore, un niveau significativement différent des contrôles (Figure 91). Le cumul des 2 types de redressements montre des variations statistiquement significatives uniquement pendant la troisième mn du test (Tableau 63). Le DZP diminue significativement ce paramètre alors que le SLC14 le diminue à la plus forte dose d'une manière non significative. Le nombre total de redressements des 2 types tend à diminuer d'une manière non significative avec le DZP et le SLC14, cette diminution étant dose-

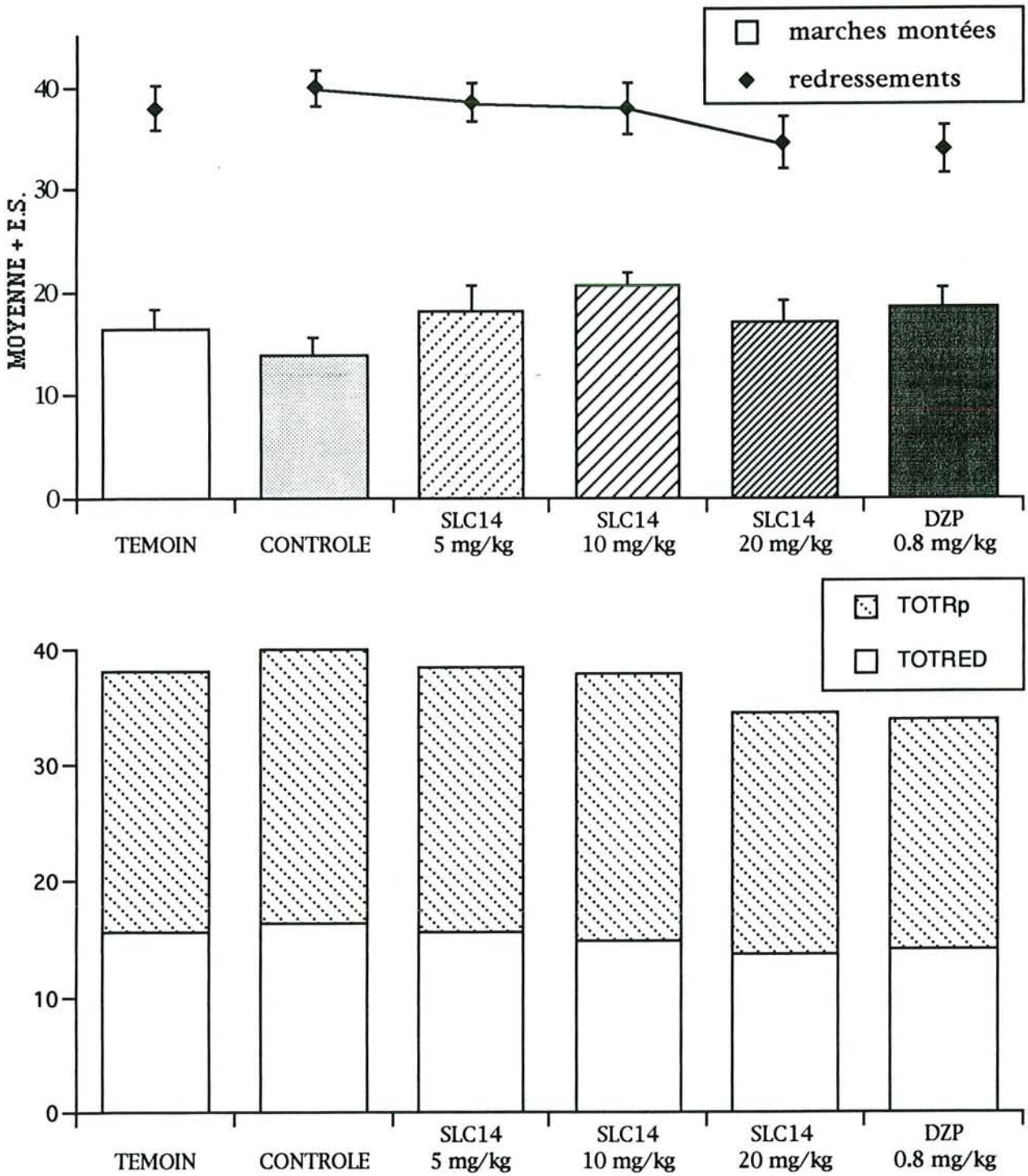


Figure 91: Expérience n°11D: Effets du SLC14 (5-20 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas).

dépendante avec le SLC14. Le nombre total de toilettages est diminué avec les 2 plus faibles doses de SLC14 et retourne à un niveau comparable aux contrôles avec 20 mg de SLC14 par kg. Le DZP n'affecte pas les toilettages. Les défécations et les latences de montée de première et dernière marche ne sont pas influencés par les différents traitements d'une manière significative. Les latences de montée des marches ont toutefois tendance à diminuer avec le SLC14 et le DZP, par rapport au lot contrôle.

Donc, le SLC 14 et le DZP ne présentent pas d'effet de type anxiolytique significatif aux doses testées lorsque l'injection i.v. est réalisée 2 h avant le test. Cependant, comme c'était le cas 1 h après l'administration, le DZP ne diminue pas le nombre de marches montées et tend toujours à diminuer le nombre total de redressements effectués, mais sans atteindre cette fois-ci, le seuil de significativité. Le SLC14 tend à augmenter le nombre de marches montées et à diminuer le nombre total de redressements et montre donc un profil comparable à celui observé 1 h après le traitement dans l'expérience n°5D. Cependant, 1 h après le traitement, le SLC14 avait tendance à diminuer le nombre total de redressements et diminuait significativement les redressements avec les pattes antérieures en l'air aux doses 5 et 10 mg/kg. Après 2 h par contre, on observe une diminution dose-dépendante du nombre total de redressements et du nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air, n'atteignant pas le seuil de significativité, même avec 20 mg/kg. Le fait d'allonger la durée entre le traitement et le test n'a donc pas permis de faire apparaître une augmentation de l'activité du SLC14 mais a augmenté la dose nécessaire pour faire apparaître une diminution des redressements. Après 1 h, le SLC14 semble donc montrer des effets de type anxiolytique puisqu'il diminue les redressements avec les pattes antérieures en l'air, mais ces effets sont légèrement différents de ceux du DZP, qui diminue les 2 types de redressements. Le SLC14 ne montre pas une activité significative après 2 h dans le test de l'escalier, contrairement aux observations de Anderson *et al.* (1987a) qui, dans une procédure de conflit choc électrique-boisson, avaient montré une activité anxiolytique du SLC14 maximale après 2h et s'étalant sur 8 h.

L. Expérience n°12D : Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v.) et du DZP (0.8 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10% (2 semaines d'habituation)

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 71 rats mâles Wistar de 150-200 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.

TRAITEMENT	TEMOIN		CONTROLE		SLC15 5 mg/kg		SLC15 10 mg/kg		SLC15 20 mg/kg		DZP 0.8 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
ASC1	4,2	0,7	4,4	0,8	4,5	0,7	6,3	0,7	5,1	0,8	4,6	0,7
ASC2	5,8	0,9	5,8	0,7	7,5	1,1	9,5 °°**a	0,7	6,3 c	0,6	6,1	1,0
ASC3	9,2	1,1	7,3	0,7	8,9	0,7	7,8	0,9	7,4	1,2	7,4	1,0
TOTASC	19,1	2,2	17,4	1,7	20,9	1,7	23,6	2,0	18,8	2,1	18,1	1,7
DESC1	2,3	0,6	2,3	0,5	2,5	0,6	4,3	0,7	3,3	0,6	2,5	0,6
DESC2	6,4	0,9	6,5	1,0	7,7	0,8	8,7	1,2	6,6	0,7	6,1	0,7
DESC3	8,7	1,3	6,9	0,8	7,5	1,0	8,4	1,1	6,8	1,1	7,8	1,0
TOTDESC	17,3	1,9	15,7	2,0	17,8	2,0	21,4	2,0	16,8	1,8	16,3	1,6
MARCHES TOT	36,4	4,0	33,1	3,7	38,7	3,6	45,0	3,9	35,6	3,9	34,4	3,3
RED1	1,9	0,5	1,8	0,5	3,5	0,8	1,9	0,6	1,6	0,5	1,3	0,4
RED2	4,7	0,7	5,3	0,6	5,6	1,3	6,0	1,0	5,7	0,8	5,1	0,9
RED3	8,2	0,8	6,9	0,9	7,4	1,6	6,0	0,8	6,7	1,2	6,1	0,6
TOTRED	14,8	1,4	14,0	1,2	16,5	3,0	13,9	1,8	13,9	1,6	12,4	1,4
Rp1	9,7	0,6	9,8	0,8	12,0	0,8	11,5	0,7	10,0	0,7	9,6	1,1
Rp2	7,3	0,9	7,7	0,6	7,7	0,7	8,3	0,6	8,7	0,8	7,2	0,7
Rp3	7,3	0,6	7,0	0,8	8,4	0,7	8,7	0,6	8,0	1,1	6,8	0,4
TOTRp	24,3	1,1	24,4	1,1	28,1 °*a	1,1	28,4 °*a	1,2	26,7	2,1	23,5	1,6
R+Rp1	11,6	0,7	11,6	0,9	15,5 °°**a	0,9	13,4	1,0	11,6 b	0,9	10,8	1,3
R+Rp2	11,9	1,1	12,9	0,7	13,4	1,3	14,3	1,2	14,3	1,5	12,3	1,3
R+Rp3	15,5	1,1	13,9	1,3	15,7	1,9	14,7	1,2	14,7	1,5	12,8	0,6
TOTRR	39,0	1,5	38,4	1,8	44,6	3,5	42,3	2,7	40,6	3,1	35,9	2,5
DEF1	0,6	0,2	0,4	0,2	0,6	0,3	0,8	0,3	0,2	0,1	0,8	0,3
DEF2	0,7	0,3	1,1	0,4	1,0	0,5	0,9	0,5	0,3	0,2	1,4	0,6
DEF3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,8	0,5	1,3	0,5	1,0	0,4	0,8	0,4
TOTDEF	1,8	0,5	2,0	0,7	2,5	0,7	3,1	0,9	1,5	0,7	3,0	1,0
TOIL1	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,2	0,2
TOIL2	0,7	0,2	0,3	0,2	1,1	0,3	0,3	0,1	0,8	0,2	0,5	0,2
TOIL3	0,6	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2	0,4	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2
TOTTOIL	1,4	0,3	0,8	0,2	1,5	0,3	0,7	0,2	1,5	0,3	1,1	0,3
LAT M1	27,2	8,2	20,9	3,6	20,4	2,6	18,3	3,0	16,3	2,3	21,1	7,6
LAT M5	98,3	17,0	97,1	15,2	87,1	15,5	77,1	14,0	102,8	17,6	69,9	13,4

Tableau 64: Expérience n°12D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, dans le test de l'escalier, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience. °: $p < .05$, °°: $p < .01$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$, **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle; **a**: $p < .05$ par rapport au DZP; **b**: $p < .01$ par rapport à 5 mg/kg; **c**: $p < .01$ par rapport à 10 mg/kg (test de Mann-Whitney). N = 11 à 12 par lot.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 120 mn avant le test :
  * Lot témoin : NaCl 9‰ (N = 12) ;
  * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 12) ;
  * Lots traités avec le SLC15 : 5 mg/kg (N = 11) ;
    10 mg/kg (N = 12) ;
    20 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.
  * Lot traité avec le DZP : 0.8 mg/kg (N = 12), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

2. Résultats

Aucune toxicité n'a été détectée aux doses testées. Les résultats recueillis sont reportés dans le Tableau 64 et l'analyse par le test de Kruskal-Wallis donne les valeurs suivantes (DDL = 5, N = 73) :

- ASC1 : H = 4.08 ; N.S.
- ASC2 : H = 14.48 ; p = .0129
- ASC3 : H = 4.97 ; N.S.
- TOTASC : H = 6.27 ; N.S.
- DESC1 : H = 7.22 ; N.S.
- DESC2 : H = 3.79 ; N.S.
- DESC3 : H = 2.60 ; N.S.
- TOTDESC : H = 4.79 ; N.S.
- MARCHES TOT : H = 5.36 ; N.S.
- RED1 : H = 6.22 ; N.S.
- RED2 : H = 1.47 ; N.S.
- RED3 : H = 4.28 ; N.S.
- TOTRED : H = 1.75 ; N.S.
- Rp1 : H = 8.71 ; N.S.
- Rp2 : H = 2.84 ; N.S.
- Rp3 : H = 6.69 ; N.S.
- TOTRp : H = 11.43 ; p = .0434
- R+Rp1 : H = 12.79 ; p = .0254
- R+Rp2 : H = 3.17 ; N.S.
- R+Rp3 : H = 3.36 ; N.S.
- TOTRR : H = 4.35 ; N.S.
- DEF1 : H = 4.39 ; N.S.
- DEF2 : H = 2.81 ; N.S.
- DEF3 : H = 1.58 ; N.S.
- TOTDEF : H = 3.42 ; N.S.
- TOIL1 : H = 5.89 ; N.S.
- TOIL2 : H = 9.55 ; N.S.
- TOIL3 : H = 1.05 ; N.S.
- TOTTOIL : H = 8.22 ; N.S.
- LAT M1 : H = 2.18 ; N.S.
- LAT M5 : H = 3.18 ; N.S.

Comme pour les autres expériences réalisées 2 h après l'administration, très peu de différences significatives apparaissent. Les seuls paramètres présentant une hétérogénéité significative sont le nombre de marches montées pendant la deuxième mn du test, le nombre total de redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif et le nombre total de redressements des 2 types effectués pendant la première mn du test.

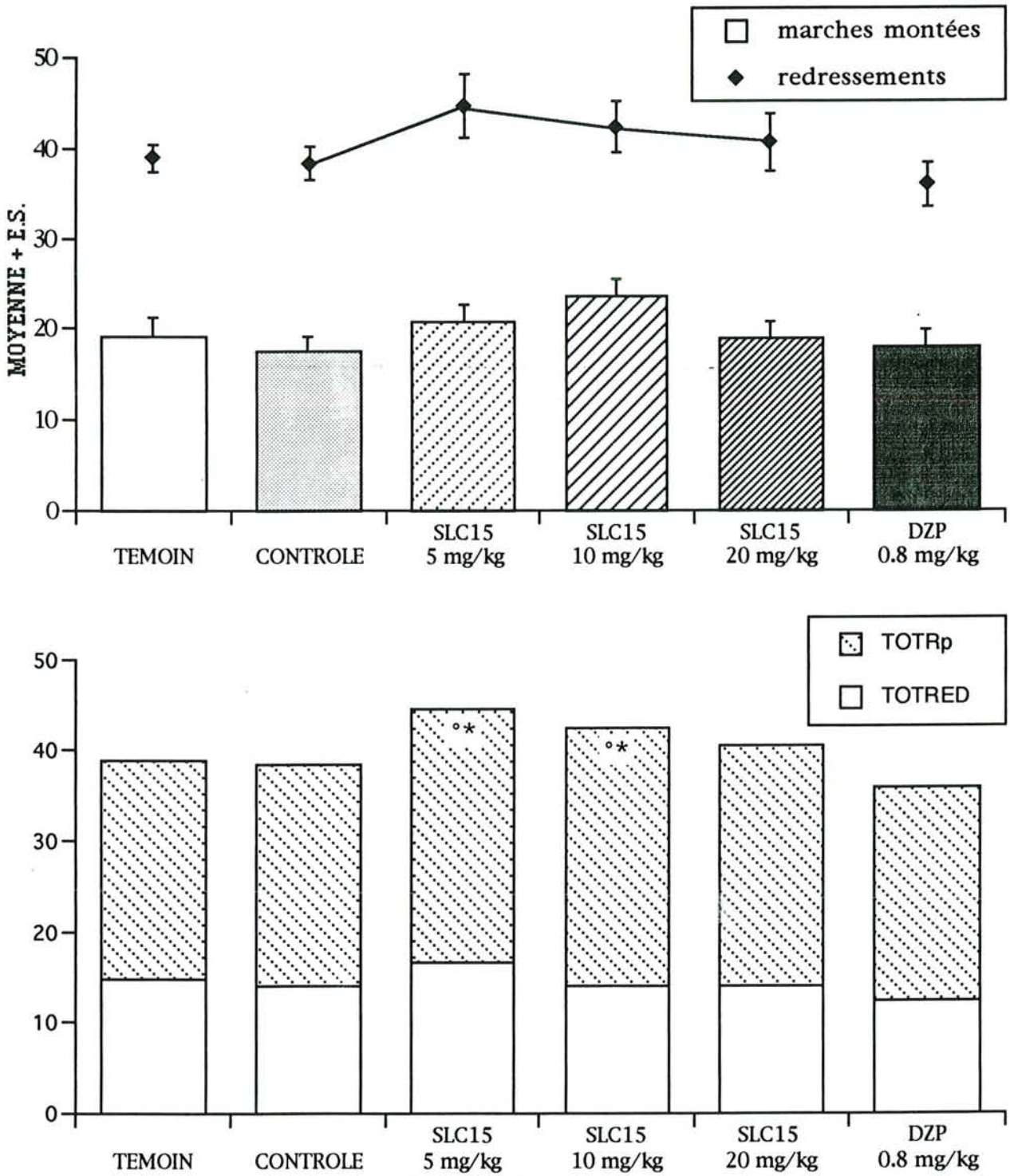


Figure 92: Expérience n°12D: Effets du SLC15 (5-20 mg/kg, i.v. 120 mn avant le test) et du DZP (0.8 mg/kg) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur le nombre total de marches montées et de redressements effectués (haut) et sur les 2 types de redressements (bas). °: $p < .05$ par rapport au lot témoin; *: $p < .05$ par rapport au lot contrôle (test de Mann-Whitney).

Le véhicule d'injection n'affecte significativement aucun des paramètres (Tableau 64).

Le DZP ne modifie significativement aucun des paramètres. Il tend cependant à diminuer le nombre total de redressements effectués par rapport aux contrôles (Tableau 64).

Le SLC15 augmente significativement le nombre de marches montées pendant la deuxième mn du test, par rapport au lots contrôle et témoin, à la dose de 10 mg/kg (Tableau 64). Cet effet n'est pas dose-dépendant dans la gamme de doses testée. Le SLC15 provoque une augmentation du nombre total de marches montées aux 3 doses testées, mais elle n'atteint pas le seuil de significativité (Figure 92). L'activité locomotrice globale (marches montées et descendues) est comparable au lot contrôle avec 5 et 20 mg de SLC15 par kg, alors qu'elle tend à augmenter avec 10 mg/kg. Les redressements avec les pattes antérieures en l'air ne sont pas affectés par le SLC15. Par contre, les redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif augmentent d'une manière significative avec 5 et 10 mg de SLC15 par kg (Figure 92). En augmentant la dose de SLC15, on observe une diminution de ce paramètre qui retourne à une valeur comparable à celle des contrôles avec 20 mg/kg. Le cumul des 2 types de redressements montre la même évolution (Figure 92), mais la seule différence statistiquement significative par rapport aux contrôles se situe pendant la première mn du test où la plus faible dose produit une augmentation (Tableau 64). Les défécations ont tendance à augmenter avec 10 mg de SLC15 par kg, mais d'une manière non significative. Les toilettages et les latences de montée des marches 1 et 5 ne sont pas modifiés par les différents traitements.

Dans cette expérience, comme dans les 2 précédentes, le DZP n'affecte pas d'une manière significative le nombre total de marches montées et de redressements effectués. Un profil de type anxiolytique statistiquement significatif, comme celui observé à la dose de 0.8 mg/kg 1 h après le traitement, n'a donc jamais été observé après 2 h. Le profil comportemental du DZP est toujours le même 1 et 2 h après l'administration, c'est-à-dire diminution du nombre de redressements ne s'accompagnant pas d'une diminution du nombre de marches montées, mais ces variations n'atteignent plus le niveau de significativité statistique après 2 h.

Comparons ces résultats avec ceux obtenus lorsque l'administration de SLC15 était réalisée 1 h avant le test (expérience n°6D) : Après 1 h, le SLC15 augmentait l'activité locomotrice et diminuait les redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif à la dose de 5 mg/kg. De plus, il augmentait les défécations à la dose de 20 mg/kg. 2 h après le traitement, il a

toujours tendance à augmenter l'activité locomotrice mais cet effet est plus marqué avec 10 mg/kg au lieu de 5. Par contre, il augmente les redressements effectués avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif avec 5 et 10 mg/kg et ne modifie plus significativement le nombre de défécations. L'activité globale du SLC15 a donc beaucoup évolué entre 1 et 2 h jusqu'à s'inverser en ce qui concerne les redressements. Cependant, il n'est pas possible d'observer un effet de type anxiolytique significatif avec le SLC15, que ce soit 1 ou 2 h après son administration. L'absence d'activité significative, relevée 1 h après l'administration, n'était donc pas imputable à un temps d'action trop court. Ainsi, on peut penser que soit le SLC 15 est éliminé avant d'atteindre le système nerveux central, soit il entre dans le système nerveux central mais ne libère pas le nipécotate, soit le nipécotate est libéré mais sous une forme inactive ou en quantité inadéquate, soit l'augmentation du taux de GABA central n'induit pas les mêmes effets que les BZD dans le test de l'escalier.

M. Discussion

L'augmentation de la durée de la période d'habituation des animaux aux conditions du laboratoire a permis, comme nous l'espèrions, d'obtenir des résultats plus homogènes en ce qui concerne les lots traités avec 0.8 mg de DZP par kg. En effet, le DZP a montré un profil comportemental de type "anxiolyse" 5 fois sur 6, lorsque le traitement était réalisé par voie i.v., 1 h avant le passage dans le test de l'escalier. Donc, les conditions expérimentales journalières permettaient de mettre en évidence une activité de type anxiolytique. Par contre, lorsque le traitement était réalisé 2 h avant le test, le DZP ne présentait plus d'activité anxiolytique significative, même en doublant la dose. Or, la demi-vie du DZP est beaucoup plus élevée (46 h environ). Donc, le mode d'injection utilisé ici ne convenait pas pour obtenir un effet anxiolytique durable avec le DZP. L'administration i.v. favorise une diffusion rapide des substances mais semble également favoriser une élimination rapide.

En ce qui concerne les SLC, le SLC14 n'a montré aucune toxicité aux doses testées. Sur le plan comportemental, il a provoqué une augmentation non significative de l'activité locomotrice à la dose de 20 mg/kg et, aux doses 5 et 10 mg/kg, une diminution significative des redressements, mais uniquement de ceux effectués avec les pattes antérieures en l'air. Il montre donc une activité proche de celle du DZP avec 5 et 10 mg/kg. Son profil d'activité est cependant légèrement différent de celui du DZP, qui diminue les 2 types de redressements. On ne peut donc pas affirmer que le SLC14, 1 h après son administration, possède une activité de type anxiolytique aux doses testées. Le SLC14 est le seul, parmi les SLC testés, à avoir fait l'objet d'études comportementales dans la littérature : Anderson *et al.* (1987a) ont

montré une activité anxiolytique avec le SLC14 (4-25 mg/kg i.v.), dans une procédure de conflit choc électrique-boisson. Cette activité était maximale 2 h après le traitement et se prolongeait pendant 8 h. Les auteurs ont vérifié l'absence d'effets analgésiques du SLC14 mais pas l'absence d'effets sur la soif. On peut donc penser que la différence de résultats dans les 2 procédures (conflit choc électrique-boisson et test de l'escalier) pourrait être liée à un effet du SLC14 sur la soif.

Le SLC13 a montré une toxicité importante aux doses testées. Afin d'augmenter les effectifs dans le calcul de la DL_{50}, les données toxicologiques des expériences n°1D, 4D et 10D ont été regroupées et la valeur ainsi obtenue est : DL_{50} = 15.3 ± 0.1 mg/kg. Cette valeur est intermédiaire entre les 2 premières obtenues mais reste assez proche des doses efficaces au niveau comportemental. En effet, nous avons obtenu un résultat positif avec le SLC13, qui présente une activité de type anxiolytique aux doses 2.5, 5, 10 et 20 mg/kg. La dose de 20 mg/kg étant particulièrement toxique, il est par conséquent difficile de parler d'activité de type anxiolytique à cette dose. Les 3 doses inférieures, par contre, ont montré un profil d'activité proche de celui du DZP et une faible toxicité. Les effets du SLC13 sur les redressements sont pourtant différents de ceux du DZP : le DZP diminue les 2 types de redressements, alors que le SLC13 diminue les redressements avec les pattes antérieures en l'air avec une intensité comparable à celle du DZP, mais ne diminue pas les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi du dispositif. Les effets du SLC13 sur le cumul des 2 types de redressements sont donc moins prononcés que ceux du DZP à la dose de 0.8 mg/kg. De plus, les dosages nécessaires pour obtenir une activité avec le SLC13 sont beaucoup plus élevés que pour le DZP. Bien qu'il diminue significativement le nombre total de redressements effectués sans diminuer l'activité locomotrice, le SLC13 montre donc une activité légèrement différente de celle du DZP.

La molécule de SLC19 ne diffère de celle de SLC13 que par la présence d'un noyau benzyle fixé sur la molécule de GABA. Le SLC19 montre, comme le SLC13 une toxicité aux doses testées, cependant moins élevée que celle du SLC13 : DL_{50} = 15.3 ± 0.1 mg/kg pour le SLC13 et DL_{50} = 44.1 ± 5.6 mg/kg pour le SLC19. Sur le plan comportemental, le SLC19, à la dose de 20 mg/kg, montre un profil de type anxiolytique comparable à celui du DZP à la dose de 0.8 mg/kg. Il faut donc multiplier par 25 le dosage efficace du DZP pour obtenir un effet avec le SLC19. De plus, les effets du SLC19 sont moins marqués que ceux du DZP, comme dans le cas du SLC13. Les 2 SLC diminuent uniquement les redressements avec les pattes antérieures en l'air, alors que le DZP diminue toujours les 2 types de redressements. L'adjonction d'un noyau benzyle sur la molécule de SLC13 permet donc d'obtenir une molécule moins toxique. Mais cette diminution de toxicité s'accompagne également d'une diminution

de l'efficacité puisque la dose minimale efficace de SLC13 était de 2.5 mg/kg, alors qu'elle s'élevait à 20 mg/kg pour le SLC19.

Le SLC18 contient le même transporteur que le SLC13 et le SLC19 mais transporte une molécule de nipécotate à la place du GABA. Contrairement à ces derniers, il est dépourvu d'effet toxique aux doses testées. Comme ces derniers, il a montré une diminution des redressements avec les pattes antérieures en l'air (aux doses 5 et 20 mg/kg) sans modification significative des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif. En ce qui concerne le nombre total de redressements des 2 types, le SLC13 produisait une diminution significative, alors que la diminution produite par le SLC18 et le SLC19 n'était pas significative. Dans l'expérience avec le SLC18, l'activité locomotrice était diminuée d'une manière significative par le DZP, alors que ce n'était pas le cas du5 SLC18. Le SLC18 montre donc une activité proche de celle du DZP dans le test de l'escalier, mais est dépourvu d'effets secondaires sédatifs, contrairement au DZP. Toutefois, ce dernier diminue les 2 types de redressements. L'activité du SLC18 est donc moins marquée que celle du DZP et nécessite des doses beaucoup plus élevées.

En ce qui concerne les effets toxiques, les SLC13, 18 et 19 sont très différents : le premier montre une DL_{50} proche des doses actives, le troisième montre également des effets toxiques mais sa DL_{50} est beaucoup plus élevée que celle du SLC13 et plus éloignée des doses actives, alors que le SLC18 est dépourvu de toxicité aux doses testées. La liaison du transporteur à une molécule de nipécotate (SLC18) n'ayant pas montré d'effets toxiques, la toxicité des SLC13 et 19 est donc liée, non pas à la molécule de transporteur seule, mais au complexe transporteur-substance active et lorsque la substance active est le GABA, l'adjonction d'un noyau benzyl sur la molécule de GABA ne faisant que réduire et non pas disparaître la toxicité aux doses testées.

Le SLC17 contient une molécule de transporteur différente des SLC précédents. Il est constitué d'un transporteur de type quinoléine complexé à une molécule de GABA. Il est dépourvu d'effets toxiques aux doses testées mais montre un profil comportemental différent de ceux observés avec les SLC13, 14, 18 et 19. Ces derniers diminuent préférentiellement les redressements avec les pattes antérieures en l'air, alors que le SLC17 diminue uniquement les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif et ceci d'ne manière dose-dépendante. Comme le DZP, le SLC17 ne modifie pas l'activité locomotrice, mais il ne montre pas un profil comparable à celui du DZP aux doses testées en ce qui concerne les redressements. L'activité du SLC17 ne peut donc pas être assimilée à une activité de type anxiolytique aux doses testées.

Pour savoir si l'inefficacité du SLC17 était liée uniquement à la nature du transporteur, nous avons testé le SLC15, contenant le même transporteur que le SLC17 mais transportant une molécule de nipécotate à la place du GABA. Le SLC15 ne modifiait pas d'une manière significative l'activité locomotrice aux doses testées. A la dose de 5 mg/kg, il diminuait les redressements mais cette diminution n'était significative que pour les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif, comme dans le cas du SLC17. Son activité n'était pas comparable à celle du DZP. Le fait que le SLC15 transporte du nipécotate, au lieu du GABA n'a donc pas modifié l'activité comportementale. Le transporteur de type quinoléine combiné à une substance GABAergique ne produit donc pas une activité de type anxiolytique.

Certains SLC ont été testés 2 h après le traitement. Mais l'allongement de la durée séparant l'administration n'a pas permis d'augmenter l'efficacité des SLC sur le niveau d'anxiété. Au contraire, le SLC13, dépourvu d'activité sédative 1 h après le traitement, produisait une diminution de l'activité locomotrice après 2h et ne diminuait plus les redressements. Le SLC14, quant à lui, augmentait l'activité locomotrice sans modifier les redressements au bout de 2 h, alors qu'il diminuait les redressements avec les pattes antérieures en l'air sans modifier l'activité locomotrice 1 h après le traitement. Enfin, le SLC15 diminuait les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi du dispositif après 1 h et les augmentait après 2h et ne modifiait l'activité locomotrice ni 1 ni 2 h après le traitement. Cependant, le DZP ne produisait plus non plus une activité anxiolytique significative 2 h après l'injection. Il semble donc que d'une part, l'administration i.v. ne permette pas de mettre en évidence un effet anxiolytique prolongé avec le DZP et que d'autre part, l'activité des SLC sur le niveau d'anxiété ne soit pas augmentée avec l'augmentation de la durée d'action.

De nombreuses études biochimiques et électrophysiologiques suggèrent que les benzodiazépines exercent la plupart de leurs effets dans le système nerveux par l'intermédiaire d'une interaction avec le récepteur $GABA_A$ (revue dans Enna & Möhler, 1987), mais les études comportementales donnent des résultats contradictoires en fonction de la procédure et de la substance GABAergique employées. En appliquant le principe des SLC afin d'augmenter le taux central de GABA, nous n'avons pas obtenu un profil comportemental identique à celui du DZP dans le test de l'escalier. Ces données contredisent donc l'hypothèse purement GABAergique de l'effet anxiolytique des benzodiazépines proposée par plusieurs auteurs (Corda & Biggio, 1986 ; Graeff *et al.*, 1986). L'action anxiolytique des BZD ne se limite donc probablement pas au système GABAergique. Les SLC montrent dans

l'ensemble, une activité assez proche de celle du DZP, mais alors que le DZP modifie les 2 types de redressements, les SLC ne modifient qu'un des 2 types. Tous les SLC n'affectent pas le même type de redressements : les SLC13, 14, 18 et 19 diminuent les redressements avec les pattes antérieures en l'air, alors que les SLC15 et 17 diminuent les redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif. Les substances GABAergiques, qu'il s'agisse de GABA ou de nipécotate, lorsqu'elles sont combinées à des transporteurs de type mixte (SLC13, 18 et 19) induisent donc des effets comportementaux comparables à ceux provoqués par le GABA combiné à un transporteur de type dihydrotrigonelline (SLC14) mais différents de ceux provoqués lorsqu'elles sont combinées à une quinoléine (SLC15 et 17). De plus, avec le même transporteur, les effets du GABA (SLC13, 14, 17 et 19) sont comparables à ceux du nipécotate (SLC15 et 18).

II. TEST DE L'ENFOUISSEMENT DEFENSIF CONDITIONNE

Les différents SLC ont montré très peu d'activité dans le test de l'escalier. D'ailleurs, le seul composé ayant montré un profil comparable à celui du DZP, le SLC13, a montré des effets toxiques à des doses assez proches des doses actives. Les résultats du test de l'escalier ne permettant pas, à eux seuls, de définir clairement les propriétés des SLC, un second modèle animal a été employé : le test d'enfouissement défensif conditionné.

A. Expérience n°13D : Effets des SLC13, 14, 15, 17, 18 et 19 (10 ou 20 mg/kg, i.v., 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30% Tween80 10%

1. Matériel et méthodes

- Animaux : 57 rats mâles Wistar de 150-220 g (IFFA-CREDO) arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v., 60 mn avant le test :
  - * Lot contrôle : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 6) ;
  - * Lot traité avec le SLC13 : 10 mg/kg (N = 9) ;
  - * Lot traité avec le SLC14 : 10 mg/kg (N = 8) ;
  - * Lot traité avec le SLC15 : 20 mg/kg (N = 8) ;
  - * Lot traité avec le SLC17 : 10 mg/kg (N = 8) ;
  - * Lot traité avec le SLC18 : 20 mg/kg (N = 8) ;
  - * Lot traité avec le SLC19 : 20 mg/kg (N = 10), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

TRAITEMENT	CONTROLE		SLC13 10 mg/kg		SLC14 10 mg/kg		SLC15 20 mg/kg		SLC17 10 mg/kg		SLC18 20 mg/kg		SLC19 20 mg/kg	
PARAMETRE	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES	MOYENNE	ES
TPS A DROITE	464,8	4,6	408,1	24,1	455,3	9,4	421,9 **	13,2	413,5	35,7	406,0	25,7	432,7	23,0
%TPS A DROITE	96,8	0,9	85,0	5,0	94,8	1,9	87,9 **	2,7	86,1	7,4	84,6	5,3	90,1	4,8
NB APPROCHES	17,0	5,0	19,6	3,7	14,5	3,3	27,9	2,3	17,5	2,9	17,1	4,0	12,7	2,7
NB FUITES	10,7	3,7	7,8	2,4	6,9	1,6	11,0	2,2	9,4	2,6	4,6	1,8	6,4	1,6
FUITES/APPR%	51,4	13,0	40,7	7,3	51,0	5,6	37,3	5,8	49,5	9,1	21,3	6,8	56,9	9,0
REDRESSEMENTS	31,7	7,6	29,4	5,5	16,1	3,5	29,0	3,0	25,3	5,4	30,0	5,9	21,3	3,2
NB TRANSITIONS	6,3	1,3	12,1	3,1	7,1	2,6	12,5	2,5	13,4	3,5	12,4	4,4	9,6	4,0
TPS TOILETTAGE	39,0	11,7	42,3	14,7	49,8	18,3	55,6	21,5	56,3	22,7	61,6	22,5	82,0	18,5
TPS CONTACT	5,7	1,7	30,6	11,8	10,4	7,1	26,1 **	7,0	27,9	18,7	31,8	11,3	22,8	10,8
TPS CONTACT%	1,2	0,4	6,4	2,5	2,2	1,5	5,4 **	1,5	5,8	3,9	6,6	2,4	4,8	2,2
TPS ENFOUISST	48,7	29,2	54,6	24,8	128,6	31,4	121,9	29,2	110,4	42,5	69,6	31,3	67,5	34,8
%TPS ENFOUISST	10,1	6,1	11,4	5,2	26,8	6,5	25,4	6,1	23,0	8,9	14,5	6,5	14,1	7,2

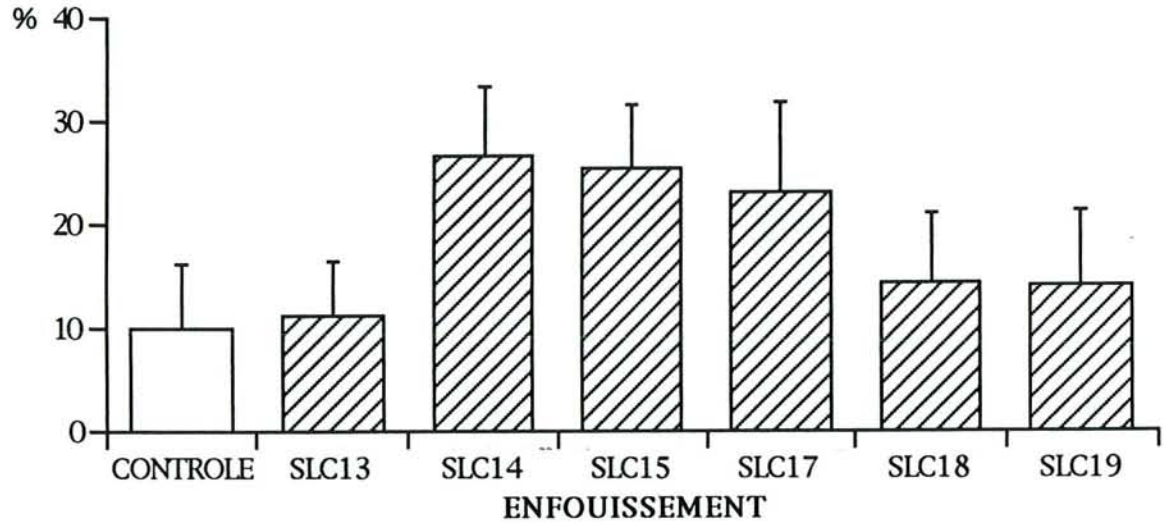
Tableau 65: Expérience n°13D: Effets des SLC13, 14, 15, 17, 18 et 19 (10 ou 20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, dans le test d'enfouissement défensif. **: $p < .01$ par rapport au lot contrôle. N = 6 à 10 par lot.

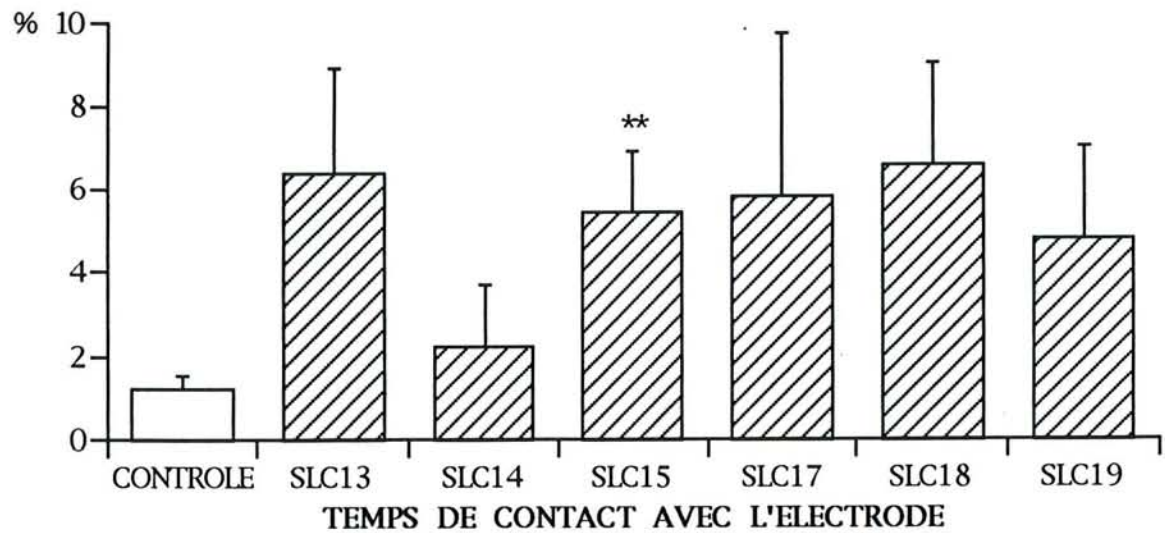
2. Résultats

Etant donné que la disponibilité en SLC était réduite, une seule dose de chaque SLC a été réalisée dans ce test. Chacun des lots traités avec un SLC a été comparé au lot contrôle avec le test de Mann-Whitney dont les résultats significatifs sont reportés, ainsi que les résultats des différents paramètres, dans le Tableau 65.

Dans ce test, les animaux sont préalablement habitués au dispositif expérimental. La seule partie du dispositif à laquelle les rats n'ont pas encore été confrontés est l'électrode. Cette particularité permet d'observer rapidement une exploration de l'électrode le jour du test et d'administrer un choc électrique au rat par son intermédiaire pendant la première mn du test. L'activité anxiolytique d'une substance est caractérisée, dans ce dispositif, par une diminution de l'enfouissement de l'électrode, une diminution des fuites et une augmentation des approches par rapport à l'électrode et par conséquent, une diminution du nombre d'approches étant suivies d'une fuite. Une augmentation du temps de contact avec l'électrode ou du temps passé dans la moitié de la cage contenant l'électrode est également prédictive d'une diminution du niveau d'anxiété. Par contre, une variation du nombre de transitions effectuées d'une moitié de la cage à l'autre peut être liée à un effet secondaire sur l'activité locomotrice.

Très peu de différences statistiquement significatives ont été relevées (Tableau 65). Il apparaît que l'ensemble des paramètres pris en compte présentent une variabilité inter-individuelle très importante qui serait à l'origine du faible nombre de résultats significatifs. Cependant, les rats traités avec les SLC passent plus de temps dans la moitié de la cage contenant l'électrode que le lot contrôle (Figure 93). Cette différence atteint une valeur significative pour le lot traité avec 20 mg de SLC15 par kg. Les rats traités avec les SLC13 et 15 effectuent plus d'approches vis-à-vis de l'électrode que les rats contrôles alors que les rats traités avec les SLC14 et 19 effectuent moins d'approches et les rats traités avec les SLC17 et 18 effectuent un nombre d'approches comparable au lot contrôle. Toutefois, aucune de ces différences n'atteint le seuil de significativité statistique. Les SLC13, 14, 17, 18 et 19 ont tendance à diminuer le nombre de fuites alors que le SLC15 ne modifie pas ce paramètre. Là encore, les modifications ne sont pas significatives du point de vue statistique. En rapportant le nombre de fuites au nombre d'approches, on observe une diminution non significative de la proportion d'approches suivies d'une fuite avec les SLC13, 15 et 18. Cette proportion reste comparable au lot contrôle avec les SLC 14 et 17 et a tendance à augmenter avec le SLC19. Les rats traités avec les SLC passent plus de temps au contact de l'électrode que les rats du lot contrôle et cette augmentation est statistiquement significative avec le SLC15 (Figure 93). Cependant, l'enfouissement





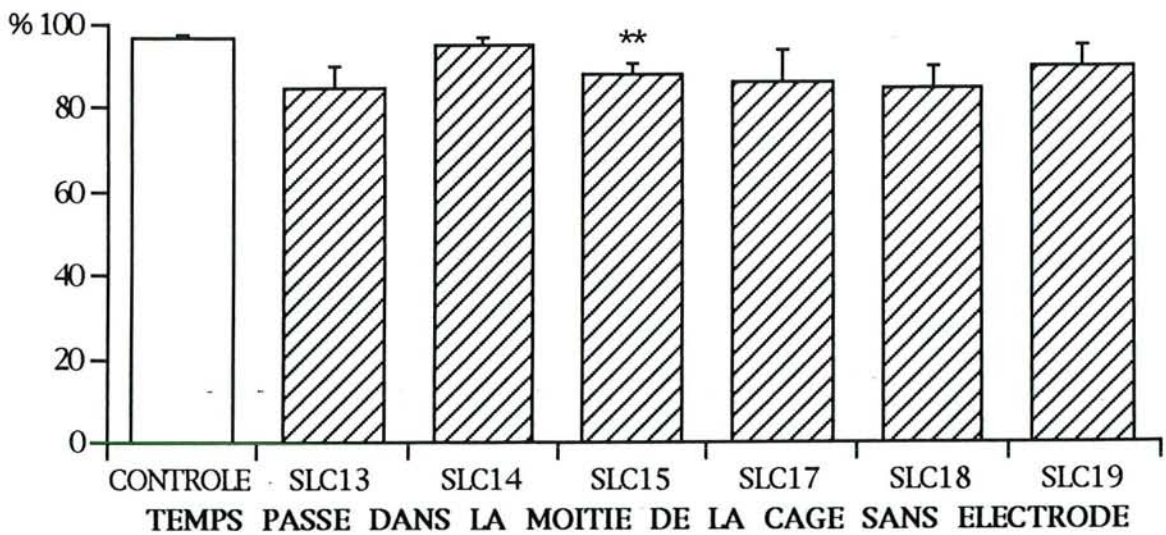


Figure 93: Expérience n°13D: Effets des SLC13, 14, 15, 17, 18 et 19 (10 ou 20 mg/kg, i.v. 60 mn avant le test) en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween 80 10%, chez des rats Wistar arrivés au laboratoire 2 semaines avant l'expérience, sur les pourcentages de temps passé à enfouir l'électrode (haut), au contact de l'électrode (milieu) et dans la moitié de la cage dépourvue d'électrode (bas).

n'est pas modifié significativement par les SLC mais a tendance à augmenter dans les lots traités avec les SLC14, 15 et 17 par rapport au lot contrôle (Figure 93). En raison des grandes variabilités inter-individuelles, les différences ne sont pas significatives pour ce paramètre.

Les redressements sont diminués par les SLC14, 17 et 19, mais d'une manière non significative. Il est intéressant de noter que le SLC13, qui était le seul à diminuer significativement le nombre total de redressements dans l'enceinte inconnue du test de l'escalier, ne modifie pas les redressements dans l'enceinte connue du test d'enfouissement. Le nombre de transitions effectuées entre les 2 moitiés de la cage constitue un indice de l'activité locomotrice. Ce paramètre montre des valeurs supérieures dans tous les lots traités avec les SLC par rapport au lot contrôle, ces différences n'atteignant toutefois pas un niveau statistiquement significatif. Il semble donc que les SLC ne réduisent pas l'activité locomotrice. Les rats traités avec les SLC ont tendance à se toiletter plus longtemps que les rats contrôles.

Si l'on ne prend en compte que le temps passé dans la moitié de la cage contenant l'électrode et le temps de contact avec l'électrode, les changements provoqués par les différents SLC vont dans le sens d'une activité anxiolytique. De plus, le nombre de fuites vis-à-vis de l'électrode n'est pas augmenté et l'activité locomotrice n'est pas diminuée par les SLC. Les redressements ne sont pas affectés non plus par les SLC, ce qui suggère que l'activité exploratoire n'est pas modifiée par les SLC. On pourrait donc penser que l'ensemble des SLC provoquent une diminution du niveau d'anxiété et sont dépourvus d'effets secondaires moteurs. Cependant, les SLC14, 15 et 17 ont tendance à augmenter l'activité d'enfouissement de l'électrode, bien que cette augmentation ne soit pas significative. Les résultats de cette expérience sont donc assez contradictoires, selon le paramètre pris en compte.

B. Discussion

En ce qui concerne les SLC13, 18 et 19, l'ensemble des changements comportementaux provoqués va donc dans le sens d'une activité anxiolytique. Le SLC15 diminue significativement le temps passé à l'opposé de l'électrode et augmente significativement le temps passé au contact de l'électrode. Mise à part une augmentation non significative de l'activité d'enfouissement, il produit donc également une activité de type anxiolytique. Les modifications provoquées par les SLC14 et 17 sont moins marquées mais, comme dans le cas du SLC15, en dehors de

l'augmentation non significative du comportement d'enfouissement, elles vont plutôt dans le sens d'une diminution du niveau d'anxiété.

Afin de pallier aux fortes variations inter-individuelles, ce test devrait être réalisé avec un effectif par lot beaucoup plus élevé. Ne disposant pas d'une quantité suffisante de SLC, nous avons été dans l'impossibilité de reproduire cette expérience avec un plus grand nombre d'individus et une gamme de dosages plus large. Toutefois, il apparaît qu'en dehors du comportement d'enfouissement qui présente une variabilité intre-individuelle très importante, les modifications induites par les SLC vont dans le sens d'une diminution de l'anxiété vis-à-vis de l'électrode, ne s'accompagnant ni d'une diminution de l'activité locomotrice, ni d'une diminution de l'activité exploratoire. Malgré l'importance de la variation inter-individuelle, les résultats obtenus dans le test d'enfouissement défensif conditionné sont donc assez proches de ceux obtenus dans le test de l'escalier. En conséquence, toutes les modifications comportementales observées avec les SLC vont dans le même sens que celles produites par les BZD, mais l'importance des modifications est moindre et ils ne produisent pas l'ensemble des effets montrés par les BZD.

CHAPITRE 8

ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES SYSTEMES DE LIBERATION CHIMIQUE

L'objectif des travaux était d'étudier l'activité *in vivo* des SLC, ce qui a été réalisé par une analyse comportementale, et de préciser si cette activité était corrélable d'une part aux paramètres physico-chimiques définis par Linget (1992) et d'autre part, à la distribution des SLC dans l'organisme après l'administration i.v.. Nous avions envisagé, dans un premier temps, de réaliser une étude cinétique à l'aide de molécules marquées radioactivement. Le transporteur et la substance active devaient être marqués à l'aide d'éléments radioactifs différents, afin d'étudier le devenir des 2 parties du SLC après la dissociation du transporteur et de la substance active. Une méthode de marquage de différents SLC a été mise au point par le Dr. J.M. Linget (dans Linget, 1992). Sa réalisation a été proposée au C.E.A. en collaboration avec une entreprise privée. Après une assez longue attente, la synthèse de ces produits radioactifs a malheureusement été jugée trop coûteuse et n'a pas pu être réalisée. La mesure des cinétiques de distribution nécessitait, par conséquent, la mise au point d'autres techniques. Une méthode de détection par HPLC de certains composés a été mise au point par le Dr. D. Decolin au Centre du Médicament (Nancy 1). Ne disposant pas, pour la plupart des SLC, à la fois de la molécule de transporteur seule, de la forme hydrophile et de la forme lipophile du SLC correspondant, l'analyse n'a été entreprise qu'avec quelques SLC, notamment le SLC14.

Afin d'étudier le devenir des SLC dans le cerveau et le sang, des échantillons de plasma et des homogénats de cerveau ont été préparés en collaboration avec le Dr. A. Minn, à partir de rats ayant reçu une administration de SLC, dans des conditions identiques à celles employées dans l'étude comportementale. Ces échantillons ont ensuite été analysés par le Dr. D. Decolin.

I. MISE AU POINT DES METHODES DE DETECTION PAR HPLC

A. Méthode de détection des SLC sous forme lipophile

1. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Colonne : Lichrosorb RP18 5 µm, 250 mm x 4 mm (MERCK)
- Phase mobile : CH_3CN/H_2O, 40 :60 (v/v)
- Débit : 1 ml/mn
- Détection U.V. à 335 nm

Dans ces conditions, les molécules étudiées sont détectées avec les temps de rétention suivants :

- forme lipophile du SLC14 : 15,16 mn
- forme lipophile du SLC17 : 13,74 mn

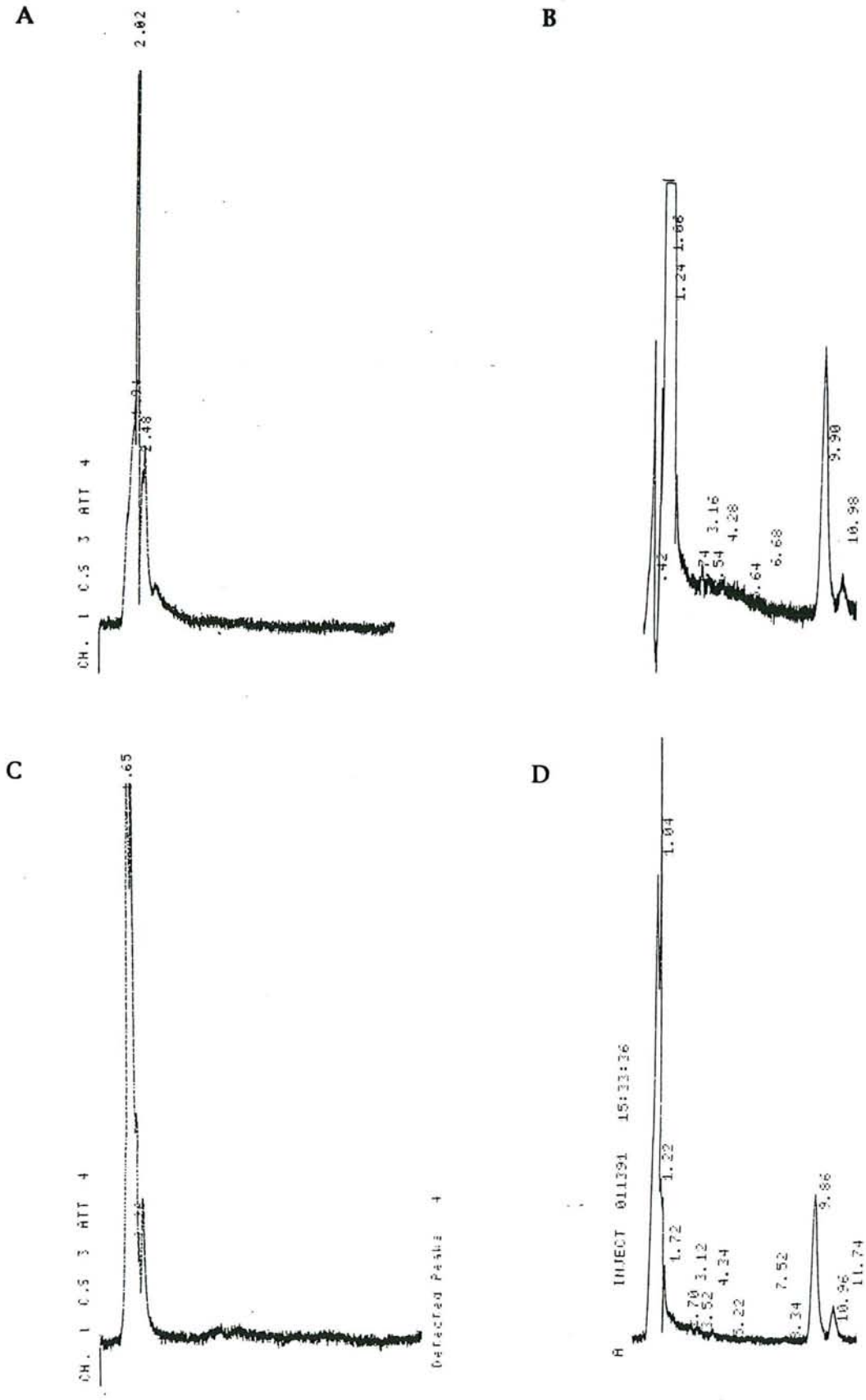


Figure 94: Vérification de la sélectivité de la détection des SLC14 et 17 sous forme lipophile, dans des échantillons de plasma et d'homogénat de cerveau. **A:** plasma contrôle; **B:** plasma surchargé en SLC14 et 17; **C:** cerveau contrôle; **D:** cerveau surchargé en SLC14 et 17. Temps de rétention du SLC14: 10.96 mn et 10.98 mn; Temps de rétention du SLC17: 9.86 mn et 9.90 mn.

2. Protocole d'analyse des échantillons et optimisation

A 200 µl de milieu biologique (plasma ou homogénat de cerveau) sont ajoutés 200 µl d'acétonitrile. La solution est agitée puis centrifugée 2 mn et 50 µl de surnageant sont injectés.

Dans ces conditions, l'injection d'un échantillon de plasma ou d'homogénat de cerveau provenant d'un rat contrôle ayant reçu une administration de véhicule seul, montre l'absence de pics endogènes aux temps de rétention correspondants aux formes lipophiles des SLC14 et 17 (Figure 94).

La limite de quantification a été déterminée dans les mêmes conditions :
- Forme lipophile du SLC14 : environ 700 ng injectés
- Forme lipophile du SLC17 : environ 70 ng injectés

Cette limite étant nettement inférieure à la quantité de SLC administrée à l'animal (au moins 2 mg), les conditions d'analyse devraient permettre de détecter la présence des SLC dans les échantillons.

Le taux de recouvrement a donné des valeurs proches de 100%. L'extraction est donc réalisée d'une manière satisfaisante, ce qui permet de valider le protocole.

B. Méthode de détection des SLC sous forme hydrophile

1. Conditions d'analyse

Etant donné que la forme hydrophile du SLC est sous forme chargée, l'analyse a été réalisée à l'aide d'une colonne échangeuse de cations. Les premières conditions d'analyse employées étaient les suivantes :
- Colonne : Sphérisorb SCX 5 µm, 250 mm x 4.6 mm (SFCC)
- Phase mobile : CH_3CN/KH_2PO_4 5 10^{-2} M, 22 :78 (v/v), pH = 2.75
- Débit : 1 ml/mn
- Détection U.V. à 230 nm

Dans ces conditions, les molécules étudiées étaient détectées avec les temps de rétention suivants :
- forme hydrophile du SLC14 : 18 mn
- forme hydrophile du SLC15 : 48 mn
- forme hydrophile du SLC18 : 28 mn

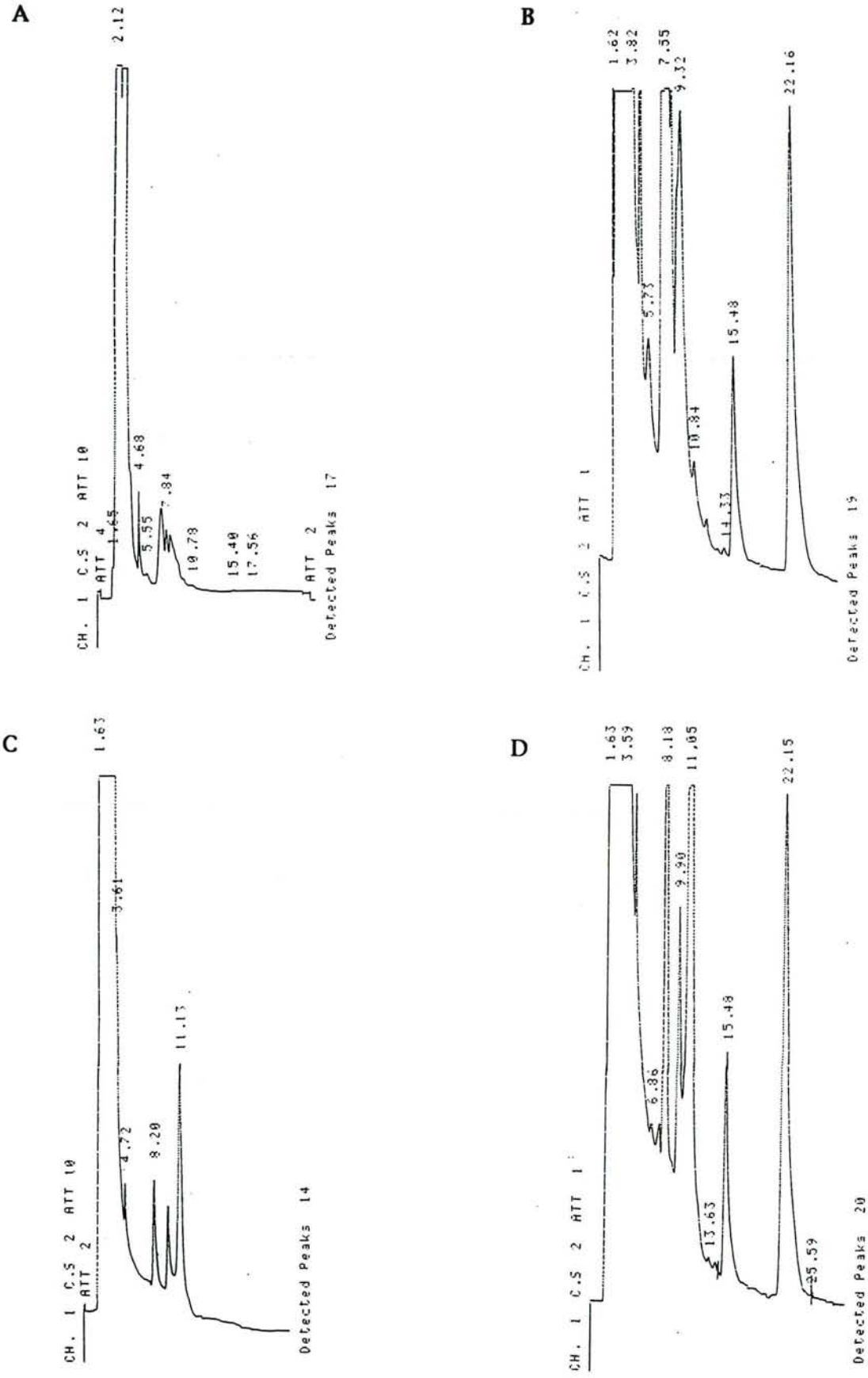


Figure 95: Vérification de la sélectivité de la détection des SLC14 et 17 sous forme hydrophile, dans des échantillons de plasma et d'homogénat de cerveau. A: plasma contrôle; B: plasma surchargé en SLC14 et 17; C: cerveau contrôle; D: cerveau surchargé en SLC14 et 17. Temps de rétention du SLC14: 15.48 mn; Temps de rétention du SLC17: 22.15 mn et 22.16 mn.

Les temps de rétention obtenus étant très longs, les conditions expérimentales ont donc été modifiées, afin de les réduire :

- Colonne : Sphérisorb SCX 5 µm, 250 mm x 4.6 mm (SFCC)
- Phase mobile : CH_3CN/KH_2PO_4 5 10^{-2} M, 22 :78 (v/v), pH = 2.75
- Débit : 1 ml/mn
- Détection U.V. à 230 nm

Dans ces conditions, 2 SLC ont été testés et montrent les temps de rétention suivants :

- forme hydrophile du SLC14 : 15,32 mn
- forme hydrophile du SLC17 : 21,87 mn

Les temps de rétention étant satisfaisants, ces conditions ont été conservées pour l'analyse des échantillons.

2. Protocole d'analyse des échantillons et optimisation

A 200 µl de milieu biologique (plasma ou homogénat de cerveau) sont ajoutés 200 µl d'acétonitrile. La solution est agitée puis centrifugée 2 mn et 50 µl de surnageant sont injectés.

Dans ces conditions, l'injection d'un échantillon de plasma ou d'homogénat de cerveau provenant d'un rat contrôle ayant reçu une administration de véhicule seul, montre l'absence de pics endogènes aux temps de rétention correspondants aux formes hydrophiles des SLC14 et 17 (Figure 95). Ces conditions expérimentales permettent donc une détection sélective de ces SLC.

La limite de quantification a été calculée dans les mêmes conditions :

- Forme hydrophile du SLC14 : environ 20 ng injectés
- Forme hydrophile du SLC17 : environ 100 ng injectés

Le taux de recouvrement a été déterminé en comparant les données obtenues après injection d'une solution étalon des formes hydrophiles du SLC14 et du SLC17 et après injection d'un échantillon témoin (plasma ou homogénat de cerveau) surchargé avec la même quantité des formes hydrophiles des SLC14 et 17 que l'étalon (250 ng de chaque molécule). Les résultats obtenus sont proches de 100%. Ces données montrent donc que l'extraction est réalisée d'une manière satisfaisante et permettent de valider le protocole.

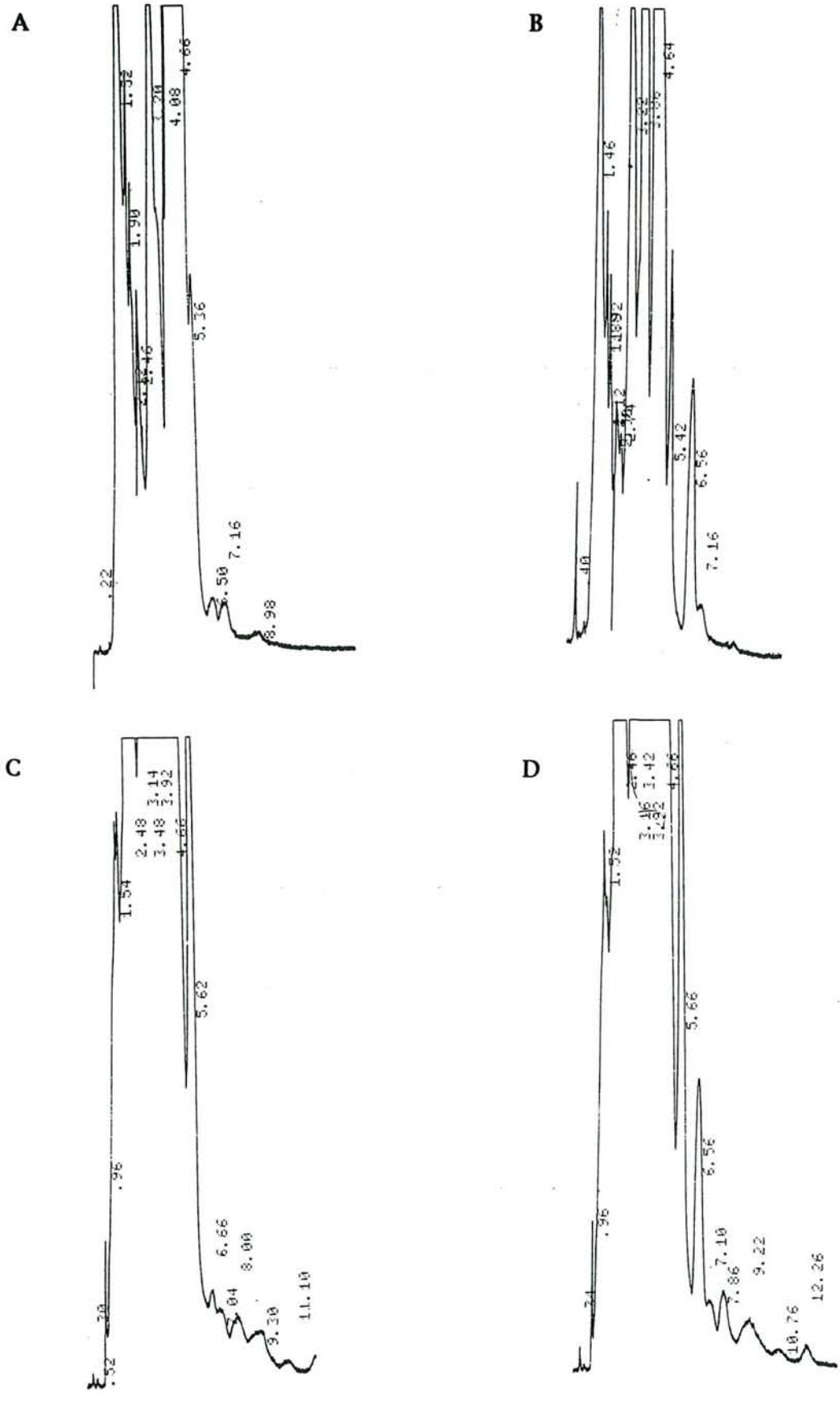


Figure 96: Vérification de la sélectivité de la détection du transporteur contenu dans le SLC14, dans des échantillons de plasma et d'homogénat de cerveau. A: plasma contrôle; B: plasma surchargé en transporteur; C: cerveau contrôle; D: cerveau surchargé en transporteur. Temps de rétention du transporteur: 6.56 mn.

C. Méthode de détection des transporteurs seuls

Le seul transporteur dont la méthode d'analyse a pu être mise au point est le transporteur de type dihydrotrigonelline, contenu dans le SLC14.

1. Conditions d'analyse

Les conditions d'analyse sont les suivantes :

- Colonne : Lichrospher Diol 5µm, 250 mm x 4 mm (MERCK)
- Phase mobile : CH_3CN/H_2O, 80 :20 (v/v)
- Débit : 1 ml/mn
- Détection U.V. à 265 nm

Dans ces conditions, le transporteur du SLC14 est détecté avec un temps de rétention de 6,56 mn (Figure 96).

2. Protocole d'analyse des échantillons et optimisation

A 200 µl de milieu biologique (plasma ou homogénat de cerveau) sont ajoutés 200 µl d'acétonitrile. La solution est agitée puis centrifugée 2 mn et 50 µl de surnageant sont injectés.

Dans ces conditions, l'injection d'un échantillon de plasma ou d'homogénat de cerveau provenant d'un rat contrôle ayant reçu une administration de véhicule seul, montre l'absence de pics endogènes au temps de rétention correspondant au transporteur (Figure 96). Les conditions d'analyse permettent par conséquent, une détection sélective du composé par rapport aux composés endogènes présents dans le cerveau et le plasma.

La limite de quantification du transporteur du SLC14 a été calculée et dans ces conditions, elle est d'au moins 25 ng injectés. Etant donné que le rat reçoit environ 2 mg de SLC, la quantité de transporteur présente dans les échantillons devrait être nettement supérieure au seuil de quantification.

Le taux de recouvrement a été déterminé en comparant les données obtenues après injection d'une solution étalon du transporteur du SLC14 et après injection d'un échantillon témoin (plasma ou homogénat de cerveau) surchargé avec le transporteur en concentration identique à l'étalon. La comparaison montre une petite interférence qui entraîne une surévaluation des résultats. Ces conditions permettent donc la détection du transporteur, mais il faudra tenir compte de cette surévaluation pour les mesures quantitatives.

D. Méthode de détection du GABA

1. Conditions d'analyse

Les premières conditions d'analyse testées étaient les suivantes :

- Colonne : Lichrospher Diol 5µm, 250 mm x 4 mm (MERCK)
- Phase mobile : CH_3CN/H_2O, 60 :40 (v/v)
- Débit : 1 ml/mn
- Détection U.V. à 220 nm
- Temps de rétention du GABA : 4 mn

Dans ces conditions, le GABA montrait un temps de rétention trop court, ne permettant pas une détction sélective. La phase mobile a donc été modifiée :

- Phase mobile : CH_3CN/KH_2PO_4 5 10^{-2} M, 75 :25 (v/v), pH = 3
- Temps de rétention du GABA : 6 mn

Dans ces conditions, l'analyse d'un échantillon de plasma ou d'homogénat de cerveau provenant d'un rat contrôle ayant reçu une administration de véhicule seul, montre une interférence du GABA avec de nombreux composés biologiques.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec une phase mobile de CH_3CN/KH_2PO_4 5 10^{-2} M, 85 :15 (v/v), pH = 3. D'autres essais ont été réalisés avec une longueur d'onde de détection de 265 nm, mais là encore, les résultats étaient négatifs.

Il n'a donc pas été possible d'obtenir des conditions analytiques satisfaisantes pour la détection du GABA, en raison d'une sensibilité insuffisante.

II. ANALYSE DU PLASMA ET DES HOMOGENATS DE CERVEAU APRES ADMINISTRATION I.V. DES SLC

A. Matériel et méthodes

- Animaux : rats mâles Wistar de 200 g.

- Traitements : Ils sont réalisés par voie i.v. 5, 15, 60 ou 120 mn avant le sacrifice :
  - * Rats contrôles : Mélange Transcutol 30%, Tween80 10% (N = 4) ;
  - * Rats traités avec le SLC14 : 10 mg/kg (5 mn : N = 3 ; 15 mn : N = 3 ; 60 mn : N = 1 ; 120 mn : N = 1) ;
  - * Rats traités avec le SLC17 : 20 mg/kg (5 mn : N = 1 ; 15 mn : N = 1 ; 60 mn : N = 1 ; 120 mn : N = 1), en solution dans le mélange Transcutol 30%, Tween80 10%.

- Préparation des échantillons :

  Les rats sont sacrifiés 5, 15, 60 ou 120 mn après le traitement par décapitation. Le sang est recueilli immédiatement et centrifugé pendant 5 mn à 4250 tr/mn. Le surnageant (plasma) est prélevé. Le cerveau total est prélevé et homogénéisé dans 5 ml d'eau distillée. Les échantillons ainsi obtenus sont congelés jusqu'au moment de l'analyse.

B. Résultats

1. Détection des SLC sous forme lipophile

L'analyse des échantillons révèle uniquement une très légère trace de SLC17 dans le plasma du rat traité 120 mn avant le sacrifice. Toutefois, 1 h après le traitement, il n'est détectable ni dans le plasma ni dans le cerveau. Les échantillons prélevés 5 et 15 mn après le traitement n'ont pas permis non plus la détection du SLC17 sous forme lipophile. Le SLC14 n'est détectable dans aucun des échantillons. Par conséquent, il semble que ces 2 composés sont éliminés en moins de 5 mn, à la fois au niveau central et à la périphérie. Ces résultats préliminaires sont en accord avec le principe des SLC : selon ce principe, lorsqu'il est administré sous forme lipophile (dihydropyridine), le SLC devrait se répartir dans tout l'organisme, y compris le SNC, et subir une oxydation rapide générant une espèce chargée hydrophile (sel de pyridinium). Cette espèce hydrophile devrait être retrouvée à la fois dans le SNC et dans le reste de l'organisme dans des temps très courts après l'administration. En raison de sa forme chargée, elle devrait être retenue centralement et éliminée rapidement à la périphérie. Il reste donc à vérifier que l'absence de la forme lipophile peut être liée à l'apparition de la forme hydrophile du SLC, qui devrait être observable principalement dans le SNC.

2. Détection des SLC sous forme hydrophile

Quelle que soit la durée entre l'administration de SLC14 et le sacrifice, aucune trace de la forme hydrophile n'a été détectée aussi bien dans le cerveau que dans le plasma. De même, 5, 15, 60 ou 120 mn après l'administration de SLC17, la forme hydrophile n'est détectable ni dans le cerveau ni dans le plasma.

Dans les conditions expérimentales employées, le SLC14 et le SLC17 ne sont donc détectables ni dans le SNC, ni dans le sang. La disparition de la forme lipophile n'était donc probablement pas imputable uniquement à une oxydation complète, puisque la forme oxydée n'a pas pu être détectée non plus. Par conséquent, soit les SLC sont éliminés avant l'oxydation et la dissociation de la substance active, soit la

dissociation est très rapide. Dans ce dernier cas, on peut espérer retrouver un certain nombre de molécules de transporteur dans l'organisme.

3. Détection des transporteurs seuls

Le seul transporteur analysé est le transporteur contenu dans le SLC14. Quelle que soit la durée entre l'administration de SLC14 et le sacrifice, aucune trace de transporteur n'a été détectée aussi bien dans le cerveau que dans le plasma. Ainsi, on peut supposer que soit le SLC14 ne se dissocie pas et est éliminé sous forme de complexe, soit il se dissocie et le transporteur libre est éliminé rapidement (moins de 5 mn) à la fois dans le sang et dans le cerveau. Or, le SLC14 n'a été retrouvé ni sous la forme de complexe lipophile, ni sous la forme de complexe hydrophile. La non dissociation ne peut donc pas justifier, à elle seule, de l'absence du transporteur. Il y a donc une élimination rapide du SLC qui a lieu soit avant soit après la dissociation du GABA. Etant donné qu'aucune trace de transporteur libre n'a été détectée, il semble fort probable que le complexe soit éliminé très rapidement et avant la dissociation.

C. Discussion

Ces résultats préliminaires semblent en désaccord avec les résultats comportementaux obtenus avec le SLC14. En effet, ce composé n'a pas montré un profil comparable à celui du DZP dans le test de l'escalier. Toutefois, le SLC14 produisait des modifications comportementales significatives, notamment une diminution du nombre de redressements avec les pattes antérieures en l'air. L'étude cinétique n'a pas permis la mise en évidence de la présence de SLC14 au niveau central, que ce soit sous forme lipophile ou hydrophile. Le transporteur seul n'a pas été détecté non plus dans le sang et dans le cerveau. En ce qui concerne le GABA, aucune méthode de détection satisfaisante n'a pas pu être définie. Cependant, étant donné que l'administration de SLC14 provoque des modifications comportementales, soit le SLC14 possède une activité comportementale propre, soit il permet une libération centrale d'une certaine quantité de GABA, que l'analyse cinétique n'a pas permis de mettre en évidence. Etant donné que les études préliminaires montrent que le SLC14 n'est plus détectable 5 mn après son administration, il semble plus probable que les effets comportementaux produits par le GABA soient liés à une libération centrale de GABA.

Anderson *et al.* (1987b) ont montré un effet anxiolytique dans le test de conflit choc électrique-boisson, avec le SLC14 (4-25 mg/kg i.v.) atteignant un maximum 2 h après le traitement et se prolongeant jusqu'à 8 h après le traitement. Par ailleurs, ces auteurs rapportaient des données cinétiques très différentes de nos

résultats. Cependant, au cours des expérimentations, nous avons employé le même mode d'administration pour les études comportementales et cinétiques alors qu'Anderson *et al.* (1987b) employaient un mode d'administration différent dans les 2 études. En ce qui concerne l'étude comportementale, le protocole était comparable à celui que nous avons adopté, l'administration étant réalisée par voie i.v. dans la veine caudale. Par contre, dans l'étude cinétique, l'administration était réalisée directement dans la carotide d'un rat anesthésié, d'une manière lente avec un débit contrôlé. Il semble que cette différence de procédure puisse être à l'origine de la différence de résultats.

L'emploi de modes d'administration aussi différents pour 2 études parallèles nous apparaît très discutable. En effet, l'utilisation de la même procédure d'administration est indispensable pour qu'une corrélation puisse être établie entre les données comportementales et les données cinétiques. Or, dans la majorité des études cinétiques des SLC reportées dans la littérature, l'administration est réalisée via la carotide de rats anesthésiés et la vitesse d'injection est lente et calibrée. Dans ces conditions, les analyses cinétiques montrent pratiquement toujours le même profil : oxydation rapide du SLC dans tout l'organisme, rétention de la forme oxydée dans le cerveau et élimination rapide en périphérie, libération soutenue et spécifique de la substance active dans le SNC, le transporteur seul n'étant pas détectable. Ce mode d'administration est, évidemment, difficilement applicable dans les études comportementales. Il semble, au vu des résultats préliminaires obtenus après administration dans la veine caudale, que ce mode d'administration, contrairement à une administration lente dans la carotide, favorise une élimination rapide du SLC14 dans tout l'organisme et que dans ces conditions, le SLC14 ne soit pas retenu au niveau central.

Toutefois, compte-tenu du caractère encore très partiel de notre étude, ces observations restent à vérifier et il est difficile d'une part, d'établir des corrélations entre les résultats comportementaux, les données cinétiques et les paramètres physico-chimiques et d'autre part d'émettre des hypothèses quant aux propriétés de distribution spécifiquement cérébrale des nouveaux SLC.

CHAPITRE 9

DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION

I. CONTRIBUTION DES DIFFERENTS MODELES ANIMAUX UTILISES

A. Test de suppression néophobique de la prise de boisson

Malick & Enna (1979) ont étudié la corrélation entre le déplacement du ^{3}H-DZP sur des membranes cellulaires de cerveau de rat par différents composés anxiolytiques et leur activité dans quatre modèles animaux :

- le test de suppression de la prise de boisson par chocs électriques (ou test de conflit choc-boisson) ;
- le test de suppression néophobique de la prise de boisson ;
- le "rotorod test" ;
- le test d'inhibition des convulsions induites par le PTZ.

Ils ont observé, avec les BZD, une corrélation significative entre la puissance de déplacement de la fixation du ^{3}H-DZP et l'activité dans le test de conflit choc-boisson. Par contre, ils n'ont observé aucune corrélation avec l'activité dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson. Or, ces deux tests comportementaux ont été proposés pour l'évaluation de l'activité anxiolytique des BZD. Ces résultats suggèrent que le site d'action des BZD dans ces deux tests serait différent : dans le test de conflit choc-boisson, l'effet des BZD résulterait d'une interaction des BZD avec le site récepteur marqué par le ^{3}H-DZP, alors que dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, l'effet des BZD serait lié soit à une activité sur ce site récepteur et à d'autres activités, soit à une activité sur un site récepteur différent (Malick & Enna, 1979). D'autre part, l'activité anticonvulsivante est corrélée au déplacement du ^{3}H-DZP. Il semble donc que le déplacement du ^{3}H-DZP soit lié à l'activité anxiolytique d'un composé, mais également à des propriétés indépendantes de l'activité anti-anxiété. Le test de suppression néophobique de la prise de boisson apparaît comme une procédure très utile pour caractériser un agent anxiolytique, permettant en outre de détecter des effets ayant un site d'action différent du site de liaison du ^{3}H-DZP. Bien que les BZD soient les agents les plus puissants dans cette procédure, celle-ci détectera également les composés non benzodiazépiniques (ex : CL 218, 872) qui déplacent le ^{3}H-DZP ainsi que ceux qui ne le déplacent pas et qui sont soit anxiolytiques chez l'homme (ex : méprobamate), soit désinhibiteurs chez l'animal (ex : tracazolate) (Voir Tableaux 17-18).

Cette procédure offre l'avantage d'évaluer une activité désinhibitrice à l'aide d'animaux non assoiffés, non affamés et sans suppression comportementale induite par des chocs électriques aversifs, ce qui limite les manipulations préliminaires des animaux. Les agents affectant directement la sensibilité aux chocs

électriques peuvent modifier le comportement de l'animal dans une procédure comme le test de conflit choc-boisson, ce qui n'est pas le cas dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson. Toutefois, ce dernier ne permet pas de discriminer les effets des substances testées sur la soif de leurs effets anxiolytiques. En effet, dans une autre procédure, Soubrié *et al.* (1976) ont observé que des rats et des souris assoiffés montraient une inhibition de la prise d'eau lorsqu'ils étaient placés dans un environnement inconnu. Les BZD augmentaient la prise d'eau par ces animaux assoiffés, mais cet effet apparaissait à la fois en situation familière et en situation inconnue (Soubrié *et al.*, 1976). Par conséquent, il semblerait qu'en plus de leurs effets anti-anxiété, les BZD interfèrent avec les mécanismes de régulation de la soif. Elles agissent également sur la prise de nourriture : Mereu *et al.* (1976) ont montré, chez le chat, que les BZD augmentaient la quantité d'aliments ingérée ainsi que la vitesse d'ingestion. Cet effet était assez important chez des chats ayant jeûné, mais encore plus marqué chez des chats rassasiés où les BZD induisaient un appétit vorace. Les chats sont toutefois particulièrement sensibles à la stimulation de l'appétit par les BZD : cet effet s'observe chez le chat, à partir de 0.3 mg d'oxazépam par kg, alors qu'une dose de 12 mg de CDP par kg est nécessaire chez le rat (Mereu *et al.*, 1976). De plus, dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, il n'y a aucune mesure de l'activité locomotrice. Par conséquent, un faible taux de boisson peut refléter à la fois une activité anxiogène et une activité sédative secondaire d'une substance. L'activité sédative d'une substance peut également interférer avec son activité anxiolytique dans ce test, en réduisant l'augmentation de prise de boisson induite par la baisse du niveau d'anxiété. Dans cette procédure, les propriétés sédatives ne peuvent donc pas être distinguées d'une modification du niveau d'anxiété.

Le test de suppression néophobique de la prise de boisson n'est donc pas suffisant à lui seul pour affirmer qu'un composé possède une activité anxiolytique mais il permet de faire rapidement et simplement le screening préliminaire d'un grand nombre de composés ou la vérification de résultats obtenus dans d'autres tests.

Dans ce test, le DZP a montré un effet anxiolyique uniquement chez le rat Long-Evans (expérience n°3B). Dans ce cas, l'effet du DZP évoluait d'une manière dose-dépendante. Par contre, chez le rat Wistar, quelque soit le véhicule employé, le DZP ne produisait pas de variation significative du taux de boisson : Avec 2 mg/kg, le DZP en solution dans l'éthanol induisait une diminution dose-dépendante mais non significative du taux de boisson ; en solution dans le DMI, le DZP produisait une augmentation non significative avec 2 mg/kg et aucune modification avec 1 et 3 mg/kg. Dans des conditions expérimentales appropriées, il est donc possible de mesurer un effet anxiolytique avec le DZP. Cependant, la prise de boisson présente

une variabilité inter-individuelle importante et est très sensible aux effets secondaires liés au véhicule d'injection, en particulier chez le rat Wistar.

Cette procédure a été appliquée au SK&F-89976-A chez le rat Wistar. Le SK&F-89976-A a provoqué une augmentation dose-dépendante mais non significative du taux de boisson avec 4 et 8 mg/kg. Avec 16 mg/kg, le taux de boisson était plus faible qu'avec 8 mg/kg, indiquant soit l'apparition d'effets sédatifs, soit une diminution de l'activité anxiolytique. Comme dans le cas du DZP, les variations n'atteignaient pas un niveau significatif, en raison d'une grande variabilité inter-individuelle et d'une sensibilité importante de la souche Wistar aux effets sédatifs. Dans cette procédure, il semblerait cependant qu'en employant des effectifs plus importants pour contrebalancer la grande variabilité inter-individuelle, des doses plus faibles de SK&F-89976-A pourraient montrer une activité anxiolytique.

Le test de suppression néophobique de la prise de boisson semble à priori représenter une procédure simple, économique et rapide de détection d'une activité anxiolytique. Cependant, l'importance des variations inter-individuelles oblige à employer un grand nombre d'animaux, ce qui augmente fortement le coût des expériences. De plus, ce test ne permet pas de distinguer les effets anxiolytiques des effets secondaires sédatifs et nécessite d'être complété par une mesure indépendante de l'activité sédative. Dans le cas du SK&F-89976-A par exemple, on observe une augmentation non significative du taux de boisson au plus faibles doses, augmentation qui s'atténue à la plus forte dose testée. L'absence de mesure indépendante de l'activité locomotrice ne permettant pas de déterminer la présence d'effets sédatifs, il n'est pas possible de déterminer si les modifications observées sont liées uniquement à une variation du niveau d'anxiété. Ce test n'a donc pas été reproduit, pour l'instant, dans l'étude des SLC.

B. Test d'inhibition des convulsions induites par le PTZ

Le maintien d'un rapport normal excitation/inhibition dans le système nerveux et par conséquent, le maintien de l'excitabilité cérébrale constitueraient l'un des paramètres physiologiques liés aux récepteurs $GABA_A$. Un excédent d'excitation ou une inhibition insuffisante, en particulier dans certaines aires corticales, le cervelet ou l'hippocampe, peut provoquer un état d'hyperexcitabilité se traduisant par une décharge épileptique focale, un état préconvulsif généralisé ou une crise convulsive. L'apparition de certaines convulsions provoquées par la maladie ou expérimentalement chez l'animal (ex : PTZ) coïncide avec une diminution de la quantité de GABA cérébral (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1987). C'est pourquoi, il semblerait qu'une atteinte des synapses inhibitrices GABAergiques constitue un

facteur causal important dans les désordres convulsifs expérimentaux et cliniques. De plus, au niveau de certains foyers épileptiques, les taux de GAD dans les terminaisons synaptiques sont inférieurs à la normale. L'apport artificiel de GABA rétablit l'équilibre du fonctionnement du cerveau et la coordination des mouvements (Lenicque, 1982).

Le PTZ réduit l'inhibition modulée par le GABA sur des neurones en culture (MacDonald & Barker, 1978b) et la libération spontanée de GABA dans des tranches de cerveau (Johnston & Mitchell, 1971). Ce convulsivant agirait notamment au niveau du site de liaison de la picrotoxine qui se trouve sur le complexe récepteur $GABA_A$/BZD (File & Pellow, 1985a). En fait, le PTZ provoquerait des convulsions par l'intermédiaire de deux mécanismes : il antagoniserait sélectivement l'inhibition post-synaptique modulée par le GABA en bloquant l'effet stimulateur du GABA sur la conductance aux ions Cl^-, mais il aurait également un effet direct sur les membranes neuronales dont il augmenterait les décharges spontanées en accroissant la perméabilité au Na^+ (Woodbury, 1983).

Les BZD, quant à elles, exerceraient une activité anticonvulsivante en augmentant les effets synaptiques du GABA et des agonistes du GABA (Haefely *et al.*, 1975 ; MacDonald & Barker, 1978a,b ; Waddington, 1978 ; Matsui & Kamioka, 1979 ; Cananzi *et al.*, 1980). Ainsi, l'augmentation de la neurotransmission GABAergique apparaît comme l'un des mécanismes sous-tendant les effets anticonvulsivants des BZD.

Il apparaît que les valeurs des ED_{50} obtenues avec différentes BZD vis-à-vis des convulsions induites par le PTZ, correspondent à leurs efficacités thérapeutiques relatives chez l'homme, ce qui n'est pas le cas pour les MES (dans Pellow, 1985). L'efficacité vis-à-vis des crises induites par le PTZ est également fortement corrélée au degré de déplacement des ^{3}H-BZD sur leurs sites de liaison dans le SNC (Malick & Enna, 1979 ; File *et al.*, 1989). Il existe par exemple, une corrélation élevée entre l'occupation des récepteurs BZD par le DZP (dans Pellow, 1985), le lorazépam ou l'oxazépam (File *et al.*, 1989) et leur efficacité contre les convulsions induites par le PTZ. Dans le cas des BZD et des barbituriques, les activités anxiolytique et anticonvulsivante sont, en général, fortement corrélées et le test des convulsions induites par le PTZ est fréquemment utilisé comme mesure de l'activité anxiolytique pour ces composés. Toutefois, en ce qui concerne les BZD, la corrélation entre ces deux activités n'est pas parfaite et ces deux activités peuvent être séparées avec certaines BZD ainsi qu'avec certains nouveaux composés anxiolytiques comme le tracazolate (dans Pellow, 1985).

Par ailleurs, le rôle du GABA dans la modulation des propriétés anticonvulsivantes et anticonflictuelles des BZD a été controversé. Certains auteurs suggèrent que les propriétés GABAergiques des BZD expliqueraient la capacité des BZD à antagoniser les convulsions produites par des substances diminuant les taux de GABA (ex : bicuculline) ou interférant avec le mécanisme de conductance aux Cl^- stimulé par le GABA (ex : picrotoxine), mais que la capacité des BZD à antagoniser les convulsions produites par le PTZ serait indépendante des interactions GABA-BZD (Lippa *et al.*, 1980). Ces derniers ont proposé l'existence de deux types de récepteurs BZD (type 1 et 2) : les effets d'une substance sur le récepteur de type 1 seraient indépendants du GABA et responsables de l'antagonisme des convulsions induites par le PTZ ; par contre, les effets d'une substance sur le récepteur de type 2 seraient associés au GABA et responsables de l'antagonisme des convulsions induites par la bicuculline et l'isoniazide. Pourtant, nous avons montré que le SK&F-89976-A, inhibiteur de la recapture du GABA, protégeait contre les convulsions induites par le PTZ. Son efficacité était cependant plus faible que celle du DZP dans les mêmes conditions. L'hypothèse de Lippa *et al.* (1980) reste donc controversée, d'autant plus que des effets anticonvulsivants de plusieurs composés GABAergiques vis-à-vis du PTZ, ont été décrits à maintes reprises dans la littérature (Wood & Peesker, 1975 ; Matthews & McCafferty, 1979 ; Löscher, 1982 ; Croucher *et al.*, 1983 ; Yunger *et al.*, 1984 ; Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1987 ; Lloyd *et al.*, 1987).

L'évaluation de l'efficacité du transport du GABA ou du nipécotate par différents SLC dans cette procédure apparaissait donc discutable. En outre, les convulsions induites par le PTZ s'accompagnent de perturbations de la BHE dont la perméabilité est accrue pendant la crise comportementale (Öztas & Sandalci, 1984). Etant donné que nous nous intéressions en premier lieu, à la mesure du passage des substances GABAergiques à travers la BHE à l'aide de SLC et à une accumulation centrale des molécules, il nous a semblé judicieux de ne pas évaluer, pour l'instant, l'activité des GABA- et nipécotate-SLC dans cette procédure.

Au cours de la réalisation de notre travail, l'activité anticonvulsivante d'une série de GABA-SLC a été évaluée par Woodard *et al.* (1990), vis-à-vis de l'extension tonique induite par les MES chez la souris. Le SLC14, notamment, protégeait 100% des animaux à la dose de 40 mg/kg, avec une ED_{50} de 15.8 mg/kg (Figure 34). Cependant, il a été montré que les valeurs des ED_{50} obtenues avec différentes BZD vis-à-vis des MES ne correspondaient pas à leurs efficacités thérapeutiques relatives chez l'homme (dans Pellow, 1985). Cette étude nécessite donc d'être complétée et il serait intéressant, dans l'avenir, de réaliser une étude plus large de l'activité anticonvulsivante des GABA- et nipécotate-SLC.

Nous avons montré que le DZP et le SK&F-89976-A, inhibiteur de la recapture du GABA traversant la BHE, présentaient des propriétés anticonvulsivantes vis-à-vis du PTZ. L'activité du SK&F-89976-A était toutefois plus faible que celle que nous avons observée avec le DZP et il semblerait que le SK&F-89976-A ne soit capable d'inhiber que les composantes généralisées de la crise. Les propriétés anticonvulsivantes des BZD semblent donc liées directement au système GABAergique, puisqu'en augmentant le taux de GABA synaptique avec le SK&F-89976-A, on observe une activité anticonvulsivante vis-à-vis du PTZ. Le système GABAergique ne semble cependant pas représenter le seul site d'action de l'activité anticonvulsivante des BZD, étant donné que le SK&F-89976-A n'inhibe qu'en partie, la crise comportementale.

Nous avons vu que d'après Woodbury (1983), le PTZ provoquerait des convulsions par l'intermédiaire de deux mécanismes : il antagoniserait sélectivement l'inhibition post-synaptique modulée par le GABA en bloquant l'effet stimulateur du GABA sur la conductance aux ions Cl^-, mais il aurait également un effet direct sur les membranes neuronales dont il augmenterait les décharges spontanées en accroissant la perméabilité au Na^+. Ceci nous amène à émettre l'hypothèse suivante : Le SK&F-89976-A pourrait, par conséquent, n'agir que sur le premier mécanisme, alors que les BZD, par l'intermédiaire d'activités indépendantes du système GABAergique, pourraient intervenir au niveau des 2 mécanismes.

C. Test du labyrinthe en croix surélevé

Ce test a été validé du point de vue comportemental, physiologique et pharmacologique, et comparé au test de la planche à trous par Pellow *et al.* (1985) :

Concernant la validation comportementale, des souches différentes de rats ont été employées ("hooded Lister" et Wistar) et aucune différence de comportement n'a été observée entre ces deux souches, dans le dispositif. Les deux sont donc valables pour le test. Par contre, avec une autre souche, les "black hooded PVG rats", l'aversion pour les bras ouverts n'est pas reproductible (Pellow *et al.*, 1985). Les auteurs ont également montré que le test pouvait être reproduit sans modification du comportement, deux jours de suite avec le même animal, mais à partir du troisième jour, les résultats n'étaient plus assez fiables. L'influence du niveau d'éclairement du dispositif a également été évaluée : le comportement des rats dans les bras ouverts ne varie pas si on égalise l'éclairage dans les deux types de bras. Différents comportements liés à l'anxiété ont été mesurés dans les bras ouverts et fermés : on observe significativement moins d'entrées dans les bras ouverts, et significativement plus de comportements liés à l'anxiété (freezing, immobilité, défécation), par rapport aux bras fermés (Pellow *et al.*, 1985).

Concernant la validation physiologique, les conditions du test induisent une modification significative des taux plasmatiques de corticostérone. Lorsque les animaux sont maintenus confinés pendant 20 mn soit dans les deux bras ouverts, soit dans les deux bras fermés, leurs taux de corticostérone sont significativement plus élevés que ceux de rats restés dans leur cage d'habitation. De plus, les taux de corticostérone sont significativement supérieurs chez les rats confinés dans les bras ouverts par rapport aux rats ayant séjourné dans les bras fermés (Pellow *et al.*, 1985). L'exposition aux bras ouverts semble donc plus stressante, comme le suggérait Montgomery (1955).

La validation pharmacologique était destinée à vérifier si le comportement mesuré dans le labyrinthe en croix surélevé reflétait spécifiquement l'anxiété. Si tel était le cas, il devrait être possible de manipuler ce comportement d'une manière spécifique, avec des substances affectant l'anxiété et non avec des substances affectant d'autres systèmes comportementaux. Les substances anxiolytiques devraient donc augmenter spécifiquement l'exploration des bras ouverts, sans augmenter l'exploration des bras fermés, alors que les substances anxiogènes devraient réduire spécifiquement l'exploration des bras ouverts sans réduire l'exploration des bras fermés. Des membres représentatifs de deux classes de composés anxiolytiques efficaces en clinique ont ainsi été testés : le CDP et le DZP, deux BZD, et la phénobarbitone, un barbiturique. Ils ont été testés après traitement aigu ou chronique (5 jours), étant donné qu'ils sont efficaces par traitement chronique en clinique et que dans certains tests animaux, leur efficacité est accrue après prétraitement chronique (dans Pellow *et al.*, 1985). Deux composés ayant une activité anxiogène chez l'homme ont également été testés : le PTZ, un convulsivant qui agirait par l'intermédiaire du site picrotoxine du complexe récepteur GABA-BZD dans le SNC et qui, à des doses subconvulsivantes, induit des effets anxiogènes à la fois chez l'homme et chez l'animal ; et la yohimbine, antagoniste del'adrénorécepteur-α_2, qui provoque des effets anxiogènes chez l'homme et chez l'animal. Deux composés stimulants, l'amphétamine et la caféine, ayant une activité anxiogène chez l'homme et l'animal ont également été évalués dans ce test (dans Pellow *et al.*, 1985). Pour vérifier si le test était capable d'identifier des faux positifs, des représentants typiques d'autres classes de composés psychoactifs ont été étudiés : l'halopéridol, tranquillisant majeur ayant des propriétés sédatives, ainsi que l'imipramine, antidépresseur tricyclique, et la miansérine, antidépresseur atypique.

Pellow *et al.* (1985) ont observé une augmentation sélective de l'exploration des bras ouverts uniquement avec les substances anxiolytiques en clinique, c'est-à-dire le CDP, le DZP et à un degré moindre, la phénobarbitone (Tableau 21). Avec le DZP, cet effet était observable après traitement aigu ou chronique. Le premier composé anxiogène testé, la yohimbine, induisait une

diminution sélective de l'exploration des bras ouverts. Par contre, le PTZ, également anxiogène, diminuait l'exploration des deux types de bras d'une manière non spécifique (Tableau 21). Ce résultat confirme la réduction non-spécifique de l'activité observée avec le PTZ dans le test d'interaction sociale (dans Pellow *et al.*, 1985). La caféine et l'amphétamine, deux psychostimulants, ont montré une activité anxiogène spécifique dans le labyrinthe en croix surélevé. Les substances sédatives, c'est-à-dire l'halopéridol, l'imipramine et la miansérine, réduisaient l'exploration du labyrinthe, d'une manière spécifique. Il est apparu que le pourcentage de temps passé dans les bras ouverts était plus sensible aux effets des traitements que le nombre d'entrées (Pellow *et al.*, 1985).

Les effets de ces différents traitements dans le labyrinthe en croix surélevé ont été comparés à leurs effets dans la planche à trous (Pellow *et al.*, 1985). L'activité globale dans le labyrinthe était corrélée à l'exploration et à l'activité locomotrice dans la planche à trous, de telle sorte que des substances qui réduisaient le nombre total d'entrées dans les bras tendaient à réduire l'exploration des trous et l'activité motrice dans la planche à trous. La seule exception était la phénobarbitone en traitement chronique, qui réduisait l'activité dans le labyrinthe mais augmentait l'exploration des trous. Par conséquent, il semble que le nombre total d'entrées dans les bras soit une fonction des activités exploratrice et locomotrice. Le pourcentage d'entrées dans les bras ouverts n'était pas corrélé à l'activité dans la planche à trous. Les pourcentages d'entrées et de temps passé dans les bras ouverts semblent donc refléter spécifiquement l'anxiété et ne peuvent pas être expliqués uniquement par l'activité exploratrice. C'est pourquoi, le test du labyrinthe en croix surélevé a été proposé pour l'évaluation des potentialités anxiolytiques ou anxiogènes de nouveaux composés (Pellow *et al.*, 1985) et a été largement employé depuis.

Les avantages du test du labyrinthe en croix surélevé résident dans la simplicité de la procédure qui ne nécessite ni entraînement, ni stimuli nociceptifs, ni privation de nourriture ou de boisson. Or, ces derniers sont susceptibles d'altérer la réponse de l'animal aux substances testées, et les privations alimentaires nécessitent souvent des expériences supplémentaires pour contrôler les effets sur la consommation d'eau et de nourriture. De plus, ces procédures ne sont pas valables pour des composés qui interfèrent avec le comportement appétitif lui-même. Le test du labyrinthe en croix surélevé est une méthode simple de mesure de l'anxiété ne nécessitant qu'un test de 5 min et ne reposant que sur l'activité spontanée. Il permet de mettre en évidence à la fois des effets anxiolytiques et des effets anxiogènes, mais également de les distinguer des effets sur l'activité locomotrice.

A l'aide de ce test, nous avons observé des résultats contradictoires : Dans une première expérience, le DZP induisait un effet anxiolytique se manifestant par une augmentation significative du pourcentage d'entrées dans les bras ouverts aux doses 0.25, 0.5 et 1 mg/kg (expérience n°8B). Par contre, dans l'expérience suivante, malgré une réduction importante de la quantité de solvants dans le véhicule d'injection, il induisait une activité sédative aux doses 1, 1.5 et 2 mg/kg et uniquement une diminution des redressements à la dose de 0.5 mg/kg (expérience n°9B). La reproductibilité des résultats semblait donc très peu satisfaisante. Des résultats contradictoires sont également rapportés dans la littérature concernant le labyrinthe en croix surélevé, particulièrement en ce qui concerne les composés sérotonergiques. C'est pourquoi, Griebel *et al.* (1993) ont réalisé récemment une étude détaillée de l'influence de plusieurs facteurs méthodologiques (ex : degré d'illumination, période d'observation au cours de la journée et expositions répétées). Ils ont montré qu'entre 8 h et 12 h, les rats effectuaient significativement plus d'entrées dans les bras ouverts et y passaient plus de temps que les rats testés entre 14 h et 17 h. Enfin, les auteurs ont montré qu'une augmentation du niveau d'éclairement diminuait tous les paramètres comportementaux. Ces différents facteurs n'expliquent cependant pas les résultats contradictoires que nous avons obtenu dans ce dispositif. En effet, le niveau d'éclairement et les périodes d'observation étaient maintenus constants d'une expérience à l'autre. Par contre, la provenance.et le sexe des animaux était différents dans les expériences n°8B et 9B. Les rats femelles provenant de l'élevage du laboratoire ont permis la mise en évidence d'une activité anxiolytique, contrairement aux rats mâles provenant d'un centre d'élevage standardisé. Il semble donc qu'il existe d'autres facteurs qui influencent le comportement des rats dans le labyrinthe de manière à altérer les effets d'une même substance d'une expérience à l'autre, notamment la provenance, la durée d'habituation aux conditions du laboratoire et le sexe des animaux.

Par ailleurs, Griebel *et al.* (1993) ont montré qu'une exposition répétée aux conditions du test réduisait le temps passé dans les bras ouverts, le nombre d'entrées dans ces bras et l'activité locomotrice totale. De plus, File (1990) a montré que lors d'un deuxième passage dans le labyrinthe, les scores du lot contrôle n'étaient pas modifiés par rapport au premier passage, mais que les scores des rats traités avec le CDP étaient modifiés et ne présentaient plus de différences avec le lot contrôle. File (1990) en a conclu qu'une seule expérience préliminaire dans le labyrinthe, avec ou sans traitement, suffisait pour provoquer une tolérance aux effets anxiolytiques du CDP. En effet, dans l'expérience n°7B, nous avons montré que 100 mn après un premier passage sans traitement, les rats traités avec le DZP aux doses 1 ou 2 mg/kg présentaient, par rapport aux contrôles, une augmentation de la préférene pour les bras fermés et une diminution dose-dépendante de l'activité locomotrice. Les animaux employés dans les expériences n°7B et 8B avaient les mêmes

caractéristiques et la même origine. Pourtant, aux doses ayant montré une activité anxiolytique sans séjour préalable dans le dispositif (expérience n°8B), le DZP ne produisait plus d'effet anxiolytique, mais une activité sédative après un premier passage dans le dispositif (expérience n°7B). Nos résultats confirment donc à la fois les observations de File (1990), puisqu'aucun effet anxiolytique n'est plus observable après séjour préalable dans le labyrinthe, et les observations de Griebel *et al.* (1993) puisqu'une diminution de l'activité locomotrice apparaît. De plus, nos résultats montrent qu'il suffit d'un séjour de 5 mn dans le dispositif avant le test, même sans traitement, pour profuire une tolérance aux effets des BZD dans le labyrinthe en croix surélevé.

La reproductibilité des résultats n'étant pas satisfaisante dans cette procédure et la disponibilité en SLC étant limitée, nous nous sommes donc dirigés vers une étude des SLC dans un autre test avec lequel nous avons obtenu une reproductibilité satisfaisante, le test de l'escalier.

D. Test de l'escalier

D'après Lat (1965), les redressements représenteraient un état de vigilance dans une situation donnée et seraient liés à l'activité dominante, fuite ou exploration. Soubrié & Boissier (1972) ont montré que dans l'open field, les redressements étaient liés directement à l'activité locomotrice en fonction du temps, mais qu'il n'y avait pas de liaison directe entre les redressements et un comportement exploratoire non locomoteur. Lorsque le rat se trouve pour la première fois dans le dispositif expérimental du test de l'escalier, l'activité dominante est la fuite et elle est remplacée progressivement par un comportement d'exploration. Les redressements seraient donc influencés à la fois par les effets anxiolytiques et les effets moteurs, alors que le nombre de marches montées serait augmenté par l'effet anxiolytique d'une substance et diminué par ses effets moteurs. Ainsi, une diminution des redressements ne s'accompagnant pas d'une diminution de l'activité locomotrice correspondrait à une diminution de l'activité de fuite chez l'animal, et donc serait indicatrice d'une diminution du niveau d'anxiété. Une augmentation de l'activité locomotrice correspondrait à une augmentation de l'activité exploratrice et donc indiquerait une diminution du niveau d'anxiété. Par contre, une diminution parallèle de l'activité locomotrice et des redressements indiquerait une activité sédative. Un effet anxiolytique serait donc caractérisé par une diminution du nombre de redressements ne modifiant pas ou augmentant le nombre de marches montées.

Cependant, la définition de l'effet d'une substance anxiolytique dans le test de l'escalier a suscité des controverses. D'après Thiébot *et al.* (1973, 1976), l'environnement nouveau de l'escalier crée une situation où les redressements et les marches montées sont respectivement des indices de l'anxiété et du comportement

exploratoire ou locomoteur du rat, les BZD induisant une variation non parallèle des 2 paramètres, caractérisée par une diminution du nombre total de redressements à des doses qui ne modifient pas ou augmentent le nombre total de marches montées. De même, Simiand *et al.* (1984), utilisant le test de l'escalier adapté à la souris, ont suggéré que les agents anxiolytiques actifs dans des tests cliniques réduisaient le nombre total de redressements à des doses ne réduisant pas le nombre total de marches montées et que par contre, les drogues non anxiolytiques en clinique comme les neuroleptiques, les antidépresseurs tricycliques, les amphétamines, la morphine et la carbamazépine réduisaient le nombre total de redressements et le nombre total de marches montées de manière parallèle. Ce sont ces critères que nous, ainsi que d'autres auteurs, avons utilisé pour définir l'effet d'une substance anxiolytique chez le rat ou la souris (Pollard & Howard, 1986 ; Vaughn *et al.*, 1987 ; Quock *et al.*, 1987 ; Keane *et al.*, 1988 ; Pruhs *et al.*, 1988 ; Pruhs & Quock, 1989 ; Emmanouil & Quock, 1990 ; Quock *et al.*, 1992). De plus, le tétrazépam, une BZD qui dissocie la sédation des autres activités des BZD, montre comme le DZP, une diminution des redressements sans modification du nombre de marches montées aux plus faibles doses, mais contrairement au DZP, il diminue le nombre de redressements et ne diminue pas le nombre de marches montées à des doses plus élevées (Keane *et al.*, 1988). De plus, dans des cages à activité, le tétrazépam provoque une diminution de l'activité locomotrice à des doses beaucoup plus élevées que celles qui diminuent les redressements dans le test de l'escalier (Keane *et al.*, 1988). La diminution des redressements ne peut donc pas être provoquée uniquement par l'activité sédative d'une substance.

Pourtant, Stéru *et al.* (1987) ont appliqué une interprétation différente aux données collectées dans le test de l'escalier chez la souris : ils considéraient que l'effet d'une substance anxiolytique correspondait à une augmentation du nombre total de marches montées à des doses n'ayant pas d'effet sur le nombre total de redressements. Dans le cadre de cette interprétation, la diminution du nombre total de redressements serait liée à l'apparition d'une activité sédative de la substance. Différents groupes ont adopté cette définition (Misslin *et al.*, 1975 ; Stéru *et al.*, 1987 ; Belzung *et al.*, 1988 ; Porsolt *et al.*, 1988).

A ce problème d'interprétation s'ajoute la question de la spécificité soulevée par Pollard & Howard (1986) qui ont effectué une analyse systématique du test de l'escalier chez la souris en examinant un grand nombre d'agents anxiolytiques ou non anxiolytiques. Le CDP, le méprobamate, l'éthanol et de façon plus limitée la nicotine réduisaient, en effet, le nombre total de redressements à des doses ne réduisant pas le nombre total de marches montées et les agents non anxiolytiques (phencyclidine et phénacétine) produisaient des diminutions parallèles des 2 paramètres. Toutefois, les auteurs ont montré un effet anxiolytique avec la morphine et une absence d'effet avec la buspirone, un anxiolytique testé

SUBSTANCE	MARCHES MONTEES	RED	Rp	TOTAL
DZP	→	↘	↘	↘
SLC14	↗	↘	→	→
SLC13	→	↘	→	↘
SLC19	↗	↘	↘	↘
SLC18	→	↘	→	↘
SLC17	→	→	↘	↘
SLC15	↗	→	↘	↘

↗ Augmentation non significative

↘ Diminution non significative

→ Aucun changement

↘ Diminution significative

Tableau 61: Récapitulation des profils comportementaux observés avec le DZP et les SLC dans le test de l'escalier. RED: redressements avec les pattes antérieures en l'air; Rp: redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une surface du dispositif; TOTAL: cumul des 2 types de redressements.

cliniquement, ainsi qu'avec trois nouveaux anxiolytiques, le CGS 9896, la kétansérine et le tracazolate. En raison de ces dernières observations, Pollard & Howard (1986) ont conclu que le test de l'escalier chez la souris manquait probablement de spécificité pour détecter une activité anxiolytique, en particulier pour les nouveaux composés non benzodiazépiniques, mais qu'il était utile pour identifier des agents anxiolytiques plus conventionnels interagissant avec les récepteurs des BZD.

Les résultats de nos expériences montrent que le DZP diminue le nombre de redressements effectués sans affecter le nombre de marches montées (Tableau 66). Thiébot *et al.* (1973) chez le rat, ainsi que Simiand *et al.* (1984) et Pruhs & Quock (1989) chez la souris ont obtenu des résultats similaires, c'est-à-dire une diminution des redressements à des doses qui, soit n'ont pas d'effet sur le nombre de marches montées, soit l'augmentent. Pollard & Howard (1986) ainsi que Porsolt *et al.* (1988) montrent un profil identique avec plusieurs BZD. Keane *et al.* (1988) ont fait la même observation avec le tetrazépam, un dérivé des BZD. Stéru *et al.* (1987) ont montré que le DZP, chez la souris, provoquait une augmentation du nombre de marches montées sans diminution du nombre de redressements aux doses les plus faibles et une diminution des redressements sans modification des marches montées à des doses plus élevées. Donc, les résultats que nous avons obtenu avec le DZP sont en accord avec le pattern général de réponse caractérisant les BZD.

Dans la littérature concernant le test de l'escalier, soit le type de redressements pris en compte n'est pas précisé (Thiébot *et al.*, 1973, 1976 ; Misslin *et al.*, 1975 ; Simiand *et al.*, 1984 ; Houri, 1986 ; Quock *et al.*, 1987 ; Stéru *et al.*, 1987 ; Vaughn *et al.*, 1987 ; Keane *et al.*, 1988 ; Porsolt *et al.*, 1988 ; Belzung *et al.*, 1988, 1989), soit on tient compte de l'ensemble des redressements et on ne distingue pas les redressements avec les pattes antérieures en l'air des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi du dispositif (Pollard & Howard, 1986 ; Pruhs *et al.*, 1988 ; Pruhs & Quock, 1989 ; Emmanouil & Quock, 1990 ; Quock *et al.*, 1992). Enfin, Molinengo & Ricci-Gamalero (1970) ne mesurent pas les nombres de marches montées et de redressements, mais uniquement le temps mis par le rat pour atteindre le haut de l'escalier. La distinction que nous avons apportée entre les 2 types de redressements a permis de mettre en évidence une différence d'activité du DZP sur les redressements par rapport aux SLC. Le DZP diminue les 2 types de redressements, alors que les SLC provoquent une diminution significative soit des redressements avec les pattes antérieures en l'air (SLC13, 14, 18 et 19), soit des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi du dispositif (SLC15 et 17), mais jamais une diminution significative des 2 types de redressements. Le SLC13 est le seul SLC à produire une diminution significative du cumul des 2 types de redressements et présente donc le profil le plus proche du DZP que nous ayons obtenu. Aucun des autres SLC n'a montré une activité aussi comparable à celle du DZP. D'autre part, dans

le test de l'escalier, le SK&F-89976-A a montré une activité sédative dose-dépendante et aucune des doses n'a permis la mise en évidence d'une activité de type anxiolytique. L'augmentation spécifiquement synaptique de la quantité de GABA par inhibition de sa recapture, de même que l'apport de GABA exogène dans tout le SNC à l'aide des SLC, ne permettent donc pas l'apparition d'une activité de type anxiolytique tout à fait comparable à celle des BZD dans les conditions du test.

Emmanouil & Quock (1990) ont montré que le flumazénil, un antagoniste des récepteurs BZD possédant une haute affinité pour le site de liaison des BZD mais dépourvu de la capacité à augmenter l'inhibition modulée par le GABA, antagonisait les effets d'un agoniste (midazolam) et d'un agoniste inverse (noreleagnine) du récepteur BZD dans le test de l'escalier : le flumazénil seul n'avait pas d'effets sur les redressements et le nombre de marches montées ; le midazolam diminuait le nombre de redressements à des doses n'affectant pas le nombre de marches montées et cette diminution des redressements était bloquée par le flumazénil ; la noreleagnine augmentait le nombre de redressements à des doses n'affectant pas le nombre de marches montées et cette augmentation des redressements était bloquée par le flumazénil. De plus, Quock *et al.* (1992) ont montré que les effets du DZP étaient également antagonisés par le flumazénil dans le test de l'escalier. Les sites récepteurs des BZD semblent donc impliqués dans la diminution des redressements. Par contre, comme le montrent les effets produits par les SLC, le GABA ne semble pas pouvoir produire, à lui seul, des effets anxiolytiques identiques à ceux du DZP dans le test de l'escalier et en particulier, une diminution des 2 types de redressements (Tableau 66). Par conséquent, l'activité anxiolytique des BZD dépend peut-être en partie du système GABAergique, mais d'autres systèmes de neurotransmetteurs doivent également intervenir.

E. Test de l'enfouissement défensif conditionné

Le comportement d'enfouissement s'observe en réponse à des stimuli aversifs autres que les chocs électriques douloureux (Treit *et al.*, 1980), dont certains sont plus proches des stimuli que les Rongeurs sont susceptibles de rencontrer dans leur environnement naturel. Par exemple, des rats enfouissent des objets associés à des stimuli aversifs tels que des coups physiques, des souffles d'air, des flashs lumineux, des odeurs nocives et des liquides auparavant associés à des effets toxiques (dans Treit, 1985a). Les marquages territoriaux de congénères peuvent également induire l'enfouissement. De plus, il a été montré que les rats peuvent se défendre contre les serpents prédateurs grâce à des amassements de terre, en projetant la terre directement sur le serpent ou en s'enfermant en enfouissant les entrées de leurs terriers à l'approche d'un serpent (dans Treit, 1985a). Ainsi, l'enfouissement apparaît comme une réponse défensive complexe et typique des Rongeurs face à

divers stimuli aversifs se produisant dans la nature, et quand ces stimuli aversifs inconditionnels sont associés à des stimuli "normalement neutres" dans les conditions du laboratoire, "l'enfouissement défensif conditionné" émerge après une seule session d'apprentissage.

Etant donné que la réponse comportementale considérée dans ce test peut être produite sans renforcement alimentaire, les effets anxiolytiques peuvent être séparés des effets sur les comportements motivés par l'appétit, contrairement à d'autres modèles animaux.

Par contre, il semble, à première vue, impossible de séparer les effets anxiolytiques et moteurs de l'agent testé. L'effet suppresseur du DZP peut pourtant être distingué d'une atteinte motrice générale, puisque d'une part, il peut être complètement inversé en augmentant l'intensité du choc et que d'autre part, il apparaît à des doses (0.5-2 mg/kg) inférieures aux doses neurotoxiques (Treit *et al.*, 1981 ; Treit, 1985b). Blampied & Kirk (1983) ont également montré que la suppression de l'enfouissement induite par le DZP n'était pas liée à des modifications de l'activité motrice générale, en mesurant pendant le test, l'activité du rat dans l'enceinte grâce à des capteurs électroniques.

Cette procédure faisant intervenir un choc électrique, on peut penser que la suppression de l'enfouissement défensif produite par des anxiolytiques comme le DZP peut être liée à des effets analgésiques plutôt qu'anxiolytiques. Treit (1985b) a testé cette hypothèse. Il a montré, tout d'abord, que le DZP n'avait pas d'effet notable sur la latence d'évitement par des rats d'un stimulus chaud douloureux, mais qu'il supprimait fortement le comportement d'enfouissement défensif chez les mêmes animaux. De plus, il n'y avait aucune relation significative entre la latence d'évitement du stimulus chaud par les rats traités avec le DZP et leur durée d'enfouissement. L'auteur a ensuite injecté le DZP entre le choc et le test, de sorte que les rats ne pouvaient être sous l'éventuel effet analgésique du traitement au moment du choc électrique. Dans ces conditions, le DZP produisait toujours une suppression significative de l'enfouissement défensif. Enfin, Treit (1985b) a montré que le naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes) n'inversait pas l'effet suppresseur du DZP et qu'il n'avait pas, par lui-même, d'effet significatif sur l'enfouissement défensif (Tableau 26). Par conséquent, l'effet du DZP ne dépend pas des mécanismes opioïdes endogènes et il semblerait que les BZD exercent leurs effets sur l'enfouissement défensif par l'intermédiaire de mécanismes anxiolytiques plutôt qu'analgésiques.

De plus, l'effet suppresseur de l'enfouissement par les BZD peut être inversé par des antagonistes du récepteur BZD, tel que le flumazénil (Treit, 1987) et des agents anxiogènes puissants augmentent le temps passé à enfouir l'électrode

(Tsuda *et al.*, 1989). Enfin, l'absence d'interférence avec des déficits dans l'apprentissage associatif a été vérifiée par Blampied & Kirk (1983).

L'enfouissement défensif semble donc présenter les critères pharmacologiques de sensibilité dose-dépendante, d'efficacité relative et de sélectivité indispensables à un modèle animal. D'autre part, ce modèle de l'enfouissement défensif conditionné pourrait représenter une forme de comportement défensif "phylogénétiquement préparé" et pourrait ainsi être un modèle très intéressant pour l'étude des mécanismes d'action des agents anxiolytiques.

Dans ce modèle, les données que nous avons récoltées ont montré une grande variabilité inter-individuelle et les SLC avaient tendance à augmenter le comportement d'enfouissement, plutôt qu'à l'inhiber comme le DZP. Les modifications de ce comportement n'atteignaient cependant pas un niveau significatif. Par ailleurs, la prise en compte de paramètres différents du comportement d'enfouissement, notamment le temps passé au contact de l'électrode, a permis de montrer une activité de type anxiolytique avec les SLC.

En raison de l'importance de la variabilité inter-individuelle, ce modèle nécessite l'emploi d'effectifs très élevés. Comme la disponibilité en SLC est très réduite, des expériences supplémentaires n'ont pas pu être réalisées, afin de valider ces résultats avec des effectifs plus importants et un éventail de dosages des SLC plus large. Ces résultats restent donc à confirmer.

F. Conclusion

Pour étudier une même substance, l'emploi combiné de différents modèles animaux est particulièrement important. Dans le labyrinthe en croix surélevé, par exemple, le principal indicateur de l'anxiété est l'évitement passif de branches inconnues, surélevées et ouvertes, alors que dans le test d'enfouissement défensif conditionné, l'indicateur principal est l'enfouissement actif d'une source de choc électrique. Autrement dit, un effet anxiolytique est indiqué principalement par une augmentation d'apparition d'un comportement spécifique (activité dans les bras ouverts) dans le labyrinthe en croix surélevé et par une diminution d'apparition d'un comportement spécifique (enfouissement de l'électrode) dans le test d'enfouissement défensif conditionné. Dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson, un effet anxiolytique est également mis en évidence par l'augmentation d'un comportement (consommation d'une boisson non familière). Dans le test de l'escalier, l'activité anxiolytique est indiquée par une diminution d'un comportement (redressements) et par une non diminution ou même une augmentation d'un autre comportement (marches montées). Par conséquent, lorsqu'un composé présente un profil de type anxiolytique dans les différents

modèles, il est très peu probable que ce soit dû à des effets non spécifiques sur l'activité générale ou la sensibilité à la douleur, ou encore à une inhibition comportementale. Par contre, si un seul modèle est employé (par ex : le test d'enfouissement défensif conditionné), la seule observation d'une dimininution du comportement d'enfouissement ne permet pas d'affirmer l'existence d'une activité anxiolytique, puisqu'il pourrait s'agir uniquement d'une diminution de l'activité générale. L'emploi combiné de différents modèles animaux faisant intervenir des comportements très différents étant soit accentués soit inhibés sous l'effet d'un anxiolytique est donc indispensable à l'établissement d'un profil d'activité d'une substance nouvelle.

Ainsi, l'emploi de différents modèles a permis d'établir un profil d'activité de substances GABAergiques nouvelles (SK&F-89976-A et SLC) et de le comparer au profil comportemental d'une BZD largement employée en clinique, le DZP.

II. ANALYSE DES RESULTATS PAR SUBSTANCE TESTEE

A. DZP

En accord avec les données de la littérature, le DZP a montré une activité anxiolytique dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson (Poschel, 1971 ; Patel & Malick, 1983), dans le labyrinthe en croix surélevé (Handley & Mithani, 1984 ; Pellow *et al.*, 1985 ; Critchley & Handley, 1987 ; Moser *et al.*, 1988 ; Moser, 1989 ; Assié *et al.*, 1991 ; Wright *et al.*, 1991), et dans le test de l'escalier (Thiébot *et al.*, 1973). Le DZP a développé une activité anticonvulsivante dans le test d'inhibition des convulsions induites par le PTZ (Patel & Malick, 1983). L'application de cette substance bien connue aux différents modèles a permis d'établir les conditions expérimentales de mise en évidence d'une activité dans chaque modèle, permettant ainsi leur application à des substances dont le profil d'activité restait à déterminer, le SK&F-89976-A et les SLC appliqués au GABA et à l'acide nipécotique.

B. SK&F-89976-A

Le nipécotate est un inhibiteur de la recapture du GABA ne traversant pas la BHE. Il a donc été modifié chimiquement pour donner naissance à un dérivé actif du nipécotate, le SK&F-89976-A, possédant des propriétés d'inhibition spécifique de la recapture du GABA et traversant aisément la BHE, atteignant ainsi son site d'action central. Son activité anticonvulsivante a été étudiée dans différents modèles animaux où il s'est avéré très efficace (Yunger *et al.*, 1984 ; Schwark & Haluska, 1986 ; Heit & Schwark, 1988). Yunger *et al.* (1984) ont montré que, chez le rat Sprague Dawley, le SK&F-89976-A protégeait vis-à-vis de la composante extension des pattes antérieures

des convulsions et de la mort, induites par une injection lente et contrôlée de PTZ (25 mg/kg, i.v.). De même, ils ont montré une inhibition de cette composante dans les crises induites par une injection lente de bicuculline (0.4 mg/kg, i.v.). Par contre, le SK&F-89976-A n'avait pas d'effet sur les convulsions induites par la strychnine, ce qui indique une action par l'intermédiaire d'un mécanisme GABAergique *in vivo*. Ce composé inhibait également les MES chez le rat, mais d'une manière non dose-dépendante et n'atteignant pas 100% de protection même avec 160 mg/kg p.o.. Par contre, il n'avait aucun effet sur les MES chez la souris. Le rat semble donc constituer une espèce plus appropriée que la souris pour l'étude de ce composé. Les convulsions induites par le PTZ étant un modèle animal réputé indicatif de l'efficacité anticonvulsivante ches l'homme, le SK&F-89976-A devrait montrer une activité anticonvulsivante significative en clinique. Schwark & Löscher (1985) ont observé, après administration aigüe de ce composé (2-10 mg/kg i.p.), des effets anticonvulsivants dose-dépendants vis-à-vis des crises induites par embrasement amygdalien, ne s'accompagnant pas d'effets secondaires sur l'activité générale, contrairement au DZP. Schwark & Haluska (1986) ont montré, après administration chronique, une inhibition de la généralisation des crises induites par embrasement de l'amygdale, mais les crises n'étaient pas complètement inhibées. Heit & Schwark (1988) ont employé le même modèle animal et ont obtenu des résultats similaires : l'intensité minimale obtenue avec le SK&F-89976-A était de 2.3 ± 0.4 selon l'échelle de Racine (1972).

Une activité antinociceptive importante a été montrée avec ce composé, dans le test d'immersion de la queue chez la souris (Zorn & Enna, 1985). Toutefois, son activité anxiolytique n'a pas encore été étudiée. En raison de ses propriétés antinociceptives, le SK&F-89976-A n'a donc pas été testé dans le test d'enfouissement défensif conditionné, mais dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson et dans le test de l'escalier ne faisant pas intervenir de composante nociceptive. L'activité anticonvulsivante vis-à-vis du PTZ a également été évaulée, mais contrairement à Yunger *et al.* (1984), nous avons pris en compte la totalité de la crise comportementale.

Dans ces conditions, le SK&F-89976-A a montré une activité anticonvulsivante dose-dépendante, à des doses ne présentant pas d'effets secondaires observables, alors qu'une myorelaxation sévère accompagnait les effets anticonvulsivants du DZP. Cependant, contrairement au DZP, le SK&F-89976-A n'inhibait complètement les crises comportementales ainsi que Schwark & Haluska (1986) et Heit & Schwark (1988) l'avaient observé. D'après Heit & Schwark (1988), une augmentation de quantité de GABA induite par les inhibiteurs de la recapture du GABA dans des régions subcorticales telles que la *substantia nigra* serait à l'origine de l'activité anticonvulsivante de cette catégorie de substances mais, comme l'activité

électrique localisée de crise ne passe pas par la voie nigrale, le médicament est incapable de prévenir les composantes non généralisées de la crise.

En ce qui concerne l'activité anxiolytique, le SK&F-89976-A a montré une activité anxiolytique n'atteignant cependant pas le seuil de significativité statistique dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson. Dans le test de l'escalier, plus propice à la mise ne évidence d'effets secondaires, ce composé a montré une activité sédative dose-dépendante.

Le SK&F-89976-A montre donc des propriétés anticonvulsivantes à des doses plus élevées que le DZP et il n'entraîne pas une inhibition complète de la crise comportementale. Il montre cependant moins d'effets secondaires que le DZP aux doses anticonvulsivantes. Par ailleurs, il montre une activité sédative dose-dépendante dans un test de situation libre tel que le test de l'escalier, procédure sensible à la moindre activité secondaire, mais a tendance à augmenter la prise d'une boisson non familière.

En conclusion, ces résultats suggèrent que le système GABAergique est le site d'action des effets anticonvulsivants des BZD et que l'activité anxiolytique des BZD dépend au moins en partie du système GABAergique, mais que l'augmentation du taux de GABA localisée aux synapses GABAergiques n'est pas suffisante pour produire l'ensemble des activités des BZD.

C. SLC

1. Résultats comportementaux obtenus avec les SLC

Etant donné que les quantités de SLC dont nous disposions étaient limitées, ceux-ci n'ont pu être évalués que dans 2 modèles. Le test de l'escalier ayant permis d'obtenir rapidement des résultats reproductibles avec le DZP, il a été sélectionné pour l'étude des effets anxiolytiques des SLC. Dans ce test, le DZP diminue les 2 types de redressements sans diminuer le nombre de marches montées. De même, aucun des SLC testés ne diminue le nombre de marches montées, le SLC19 ayant même tendance à l'augmenter. Par contre, les SLC provoquent une diminution significative soit des redressements avec les pattes antérieures en l'air (SLC13, 14, 18 et 19), soit des redressements avec les pattes antérieures appuyées contre une paroi du dispositif (SLC15 et 17), mais jamais une diminution significative des 2 types de redressements (Tableau 66). Le SLC13 produit le profil comportemental le plus proche de celui du DZP puisqu'il diminue significativement le nombre total de redressements sans affecter le nombre de marches montées. Ainsi, bien que les SLC soient dépourvus d'effets sédatifs, contrairement au SK&F-89976-A, aucun des SLC, hormis le SLC13, n'a montré une activité comparable à celle du DZP. On retrouve des résultats similaires

dans la littérature : Par exemple, chez des patients souffrant d'anxiété chronique, le THIP, un agoniste $GABA_A$ spécifique, montre des effets anxiolytiques mais accompagnés d'effets secondaires (Hoehn-Saric, 1983) alors que le progabide, agoniste $GABA_A$ et $GABA_B$, montre des effets anxiolytiques chez l'homme, mais ils sont moins importants que ceux des BZD (dans Shephard, 1987). Enfin, le muscimol, un autre agoniste $GABA_A$, augmente les taux de réponses punies dans les tests de conflit et augmente la prise de nourriture, lorsqu'il est administré directement dans le cerveau. Par contre, dans le test de conflit choc électrique-boisson, Ågmo *et al.* (1991) ont montré que les substances GABAergiques ne produisaient pas les mêmes effets que le CDP et le DZP, et ont conclu que les récepteurs GABA n'étaient pas impliqués dans les effets anticonflit des BZD. Le baclofène et le THIP, notamment, ne montraient aucune activité anticonflit. Le SK&F-100330-A, un inhibiteur de la recapture du GABA, produisait des effets anticonflit à des doses ne réduisant pas l'activité ambulatoire, mais n'avait plus d'effet à des doses supérieures, contrairement au DZP qui avait des effets anxiolytiques à un dosage réduisant l'activité ambulatoire (Ågmo *et al.*, 1991). De plus, les effets du DZP n'étaient antagonisés ni par la picrotoxine, ni par la bicuculline.

Quock *et al.* (1992) ont suggéré que les sites récepteurs des BZD étaient impliqués dans la diminution des redressements dans le test de l'escalier. Par contre, comme le montrent les effets produits par les SLC, une augmentation générale du taux de GABA cérébral ne semble pas reproduire exactement l'ensemble des effets du DZP dans le test de l'escalier et en particulier, une diminution des 2 types de redressements. Dans le test d'enfouissement défensif conditionné, malgré le peu de résultats significatifs obtenus, les SLC ont montré dans l'ensemble, une activité de type anxiolytique sur tous les paramètres pris en compte, hormis le comportement d'enfouissement. Ainsi, là encore, l'ensemble des effets du DZP ne peut être reproduit avec une augmentation centrale du taux de GABA. Par conséquent, l'activité anxiolytique des BZD dépend probablement du complexe récepteur GABA-BZD mais les interactions au niveau de ce site semblent très complexes. De plus, ce site ne constitue apparemment pas le seul site d'action des BZD. Puisque ni l'augmentation synaptique du taux de GABA par le SK&F-89976-A, ni l'augmentation générale du taux de GABA cérébral par les GABA-SLC, ne parviennent à reproduire la totalité des effets comportementaux des BZD, d'autres systèmes de neurotransmetteurs doivent entrer en jeu. Plusieurs systèmes sont des candidats potentiels, les systèmes sérotonergique, dopaminergique, cholinergique, glycinergique et surtout le système sérotonergique.

La localisation du système GABA dans le cerveau est maintenant assez bien décrite. De plus en plus, on observe des exemples de coexistence entre le GABA et des peptides dans les mêmes neurones. Les recherches à venir devraient tenter de prendre avantage de ces interactions, ce qui permettrait peut-être d'obtenir des

substances GABAergiques ayant des effets spécifiques d'une région cérébrale et ainsi, moins d'effets secondaires.

En ce qui concerne le système sérotonergique, López-Rubalcava *et al.* (1992) ont suggéré une interaction entre les systèmes GABAergique et sérotonergique au niveau de l'activité anxiolytique du DZP. Ils ont montré que l'alprénolol, antagoniste 5-HT, ainsi que le flumazénil, antagoniste du site récepteur BZD, antagonisaient l'effet du DZP dans le test de la boîte à double compartiment. López-Rubalcava & Fernández-Guasti (1994) ont montré qu'une interaction entre la noradrénaline et la sérotonine intervenait dans les effets anxiolytiques des agonistes 5-HT1A. Söderpalm & Engel (1989) ont montré que le PCPA, inhibiteur de la synthèse de sérotonine, diminuait les taux centraux de sérotonine et produisait des effets anticonflit dans le test de suppression de la prise de boisson par chocs électriques et que ses effets comportementaux, mais non ses effets biochimiques, étaient complètement antagonisés par le flumazénil et la bicuculline. Söderpalm & Engel (1991) ont montré qu'en détruisant sélectivement les neurones sérotonergiques avec une neurotoxine, on observait, là encore, une activité anxiolytique, antagonisée par la bicuculline. Mais dans ce cas, le flumazénil était inefficace. Les auteurs suggèrent que les effets anxiolytiques, observés chez les rats dont les neurones sérotonergiques sont détruits, impliquent une augmentation de la transmission au niveau du complexe récepteur GABA-BZD. Ils suggèrent donc l'existence d'une interaction comportementale entre le système sérotonergique et le complexe récepteur GABA-BZD, peut-être par l'intermédiaire d'une interaction neuronale directe, c'est-à-dire une inhibition de la libération de GABA par les neurones 5-HT, ou par neuromodulation (Söderpalm & Engel, 1989). Fernández-Guasti & López-Rubalcava (1990) ont précisé que le récepteur 5-HT_{1A} intervenait dans l'activité anxiolytique. Hodges & Green (1984) ont montré que les effets anticonflits du CDP dans une procédure de conflit conditionné, impliquaient une augmentation de la transmission GABAergique et une diminution de la transmission sérotonergique.

De nombreuses études ont mis en évidence des interactions très complexes entre différents systèmes de neurotransmetteurs dans les ganglions basaux, notamment les systèmes dopaminergique, GABAergique et cholinergique (Chase & Walters, 1976). Ces interactions ont été très largement étudiées, avec l'intention de mieux comprendre les mécanismes qui sous-tendent la schizophrénie, la maladie de Parkinson et d'autres syndromes, et de développer de nouvelles stratégies pour le traitement de ces maladies graves. On s'est beaucoup intéressé aux neurones dopaminergiques du nigrostriatum qui font partie de la voie rétroactive nigrostriatale, c'est-à-dire la voie extrapyramidale. Les neurones GABA du nigrostriatum constituent une grande partie de cette voie et se terminent dans la

substantia nigra pars reticulata, probablement sur des neurones cholinergiques. On pense que les neurones dopaminergiques de ce système qui prennent leur origine dans la *substantia nigra pars compacta*, ainsi que les neurones dopaminergiques mésolimbiques, sont sous contrôle inhibiteur GABAergique (Chase & Walters, 1976). Ces aspects ont favorisé la recherche de thérapies GABA-stimulantes dans le traitement de la schizophrénie, et par conséquent, le THIP a été largement étudié dans différents modèles animaux.

Les interactions entre le THIP et les systèmes dopaminergiques ont notamment été étudiées chez le singe. Le profil pharmacologique complexe du THIP chez cet animal était, dans une certaine mesure, similaire à celui du DZP et on en a conclu que le THIP aurait probablement des effets thérapeutiques limités dans différents types de dyskinésies. Le THIP s'est d'ailleurs révélé inefficace vis-à-vis des symptômes de patients dyskinétiques (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

Le système GABAergique semble également présenter des interactions avec le système glycinergique. Il était généralement admis que les deux neurotransmetteurs inhibiteurs, le GABA et la glycine, opéraient par des systèmes de récepteurs différents. Ces deux systèmes sont impliqués dans le contrôle des mécanismes neuronaux dans le cerveau et dans la moelle épinière, mais, le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus important dans les régions supraspinales du SNC, alors que la glycine a un rôle dominant similaire dans la moelle épinière. Cependant, des interactions fonctionnelles entre le GABA et la glycine ont été décrites plusieurs fois, en particulier dans certaines régions cérébrales (Braestrup *et al.*, 1986) et d'après des expériences électrophysiologiques, le GABA et la glycine partageraient le même canal Cl^- (Barker & McBurney, 1979).

Il y a également plusieurs exemples de "similarités pharmacologiques" entre les mécanismes de récepteurs glycine et GABA. Ainsi, certains composés sont des antagonistes GABA et glycine à peu près aussi efficaces, et des modifications mineures d'agonistes $GABA_A$ donnent souvent des composés ayant des propriétés d'antagonistes glycine (Voir chapitre 1). Au cours des dernières années, plusieurs interactions pharmacologiques entre les mécanismes des récepteurs GABA et glycine ont été décrites. Par exemple, les inhibiteurs de la GABA-T et la glycine ont des effets anticonvulsivants synergiques, de même, la glycine amplifie l'effet protecteur du muscimol vis-à-vis de crises induites par une atteinte de la neurotransmission GABAergique (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). La glycine, lorsqu'elle est administrée conjointement avec le THPO, inhibiteur de la recapture du GABA, augmente les effets anticonvulsivants de ce dernier (dans Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a). Les mécanismes qui sous-tendent ces effets synergiques sont encore inconnus, il pourrait s'agir d'une interaction entre les récepteurs $GABA_A$ et les récepteurs glycine activés, peut-être par l'intermédiaire d'un canal Cl^- qui pourrait

être partagé par ces récepteurs (Barker & McBurney, 1979). Dans le cas du THPO, qui, en plus de son effet sur la recapture du GABA, a des propriétés d'antagoniste glycine très faibles, il est possible que l'abolition de cette faible activité par la glycine soit suffisante pour expliquer l'augmentation de l'effet anticonvulsivant du THPO résultant de son inhibition de la recapture gliale de GABA. Le THIP se lie également très faiblement au récepteur glycine (Braestrup *et al.*, 1986), peut-être comme antagoniste, et son effet antiépileptique curieusement faible pourrait s'expliquer en partie par un faible effet anti-glycine qui réduirait l'effet inhibiteur résultant de l'activation des récepteurs $GABA_A$. Toutefois, le faible effet antiépileptique du THIP pourrait également refléter le fait que l'hyperpolarisation prolongée des membranes neuronales, due à l'activation efficace et soutenue par des agonistes $GABA_A$, serait trop "non-physiologique" pour provoquer l'effet inhibiteur souhaité, et serait partiellement abolie par des mécanismes compensateurs encore inconnus (Krogsgaard-Larsen *et al.*, 1988a).

Gray (1988) a émis une intéressante théorie concernant les systèmes cérébraux impliqués dans l'activité des substances anxiolytiques. Les BZD facilitent l'action du GABA sur les récepteurs $GABA_A$ et augmentent donc l'inhibition GABAergique. Elles agiraient de cette manière dans tous les circuits qui sont activés dans une situation donnée. La réduction sélective de l'anxiété reposerait donc sur la situation anxiogène, et non pas principalement sur le profil neurochimique de la substance. Selon cette théorie, chez l'animal non drogué, le stress induirait une augmentation de l'activité de fibres noradrénergiques et sérotonergiques ascendantes, qui augmenterait la capacité d'analyse de l'information du système septo-hippocampal et de son circuit associé, le circuit de Papez. Cette capacité serait mise au service de l'analyse de la menace. Le principal mode d'action des anxiolytiques connus, serait de renverser l'augmentation d'activité des fibres noradrénergiques et sérotonergiques ascendantes. Cette action des agents anxiolytiques semblerait modulée par les récepteurs GABAergiques situés à la fois, sur les corps cellulaires concernés (dans le locus coeruleus et les noyaux du raphé médian) et sur les terminaisons dans le cerveau antérieur. Mais quelles seraient les fonctions de ce système et par conséquent, quels processus cognitifs seraient altérés par les substances anxiolytiques ? A cette question, Gray (1988) répond que le système septo-hippocampal, avec d'autres structures comme le circuit de Papez, agirait comme un comparateur, c'est-à-dire qu'il prédirait l'état dans lequel se trouverait le monde de l'animal dans l'instant suivant (approximativement 0.1 s) et comparerait cette prédiction avec l'état actuel de l'environnement, tel qu'il est décrit par les données entrées dans le système septo-hippocampal à partir des systèmes d'analyse néocorticaux via le cortex entorhinal. En même temps que les prédictions, le système ferait appel à la description des régularités observées précédemment (ex :

stimulus-réponse) stockées dans le lobe temporal et au programme moteur en cours chez l'animal et envoyé du cortex préfrontal au cortex entorhinal et au gyrus cingulaire. Dans le cas où l'évènement présent correspondrait à la prédiction, le système continuerait en "mode vérification" afin de faire la prédiction suivante, et le contrôle du comportement serait maintenu dans d'autres systèmes cérébraux Si par contre, l'évènement présent ne correspondait pas à la prédiction ou si l'évènement prédit était aversif (ex : punition ou non récompense), alors le système passerait en "mode contrôle", prendrait le contrôle du comportement et mettrait en fonction les messages du système d'inhibition comportementale, ces messages étant une inhibition comportementale et une augmentation de l'attention et de l'excitation. Comment, dans ces conditions, les anxiolytiques affecteraient-ils les symptômes cliniques de l'anxiété ? Toujours selon Gray (1988), les activités d'information et d'analyse du système septo-hippocampal seraient mises au service de l'état d'anxiété, par l'intermédiaire d'une augmentation de l'activité monoaminergique ascendante induite par le stress. En "mode vérification", ces activités provoqueraient l'apparition du type de symptôme cognitif observé le plus clairement dans les syndrômes obsessionnels-compulsifs (vérification excessive d'un stress potentiel) ; en "mode contrôle", ils provoqueraient l'apparition des symptômes comportementaux connus, comme les phobies. De plus, l'influence descendante des fibres noradrénergiques en provenance du locus coeruleus serait responsable des symptômes autonomes de l'anxiété. Tous ces symptômes pourraient donc être affectés par un traitement anxiolytique, puisque ces substances réduiraient l'activité monoaminergique (plus précisément noradrénergique et sérotonergique) induite par le stress.

Cette théorie fait donc intervenir de nombreux neurotransmetteurs et permet d'expliquer pourquoi le fait d'affecter un seul système de neurotransmetteurs ne produit pas forcément l'ensemble des effets des BZD. Toutefois, d'après cette théorie, le seul site d'action des BZD serait le complexe récepteur GABA-BZD, ce qui ne fait pas l'unanimité.

2. Analyse par rapport aux caractéristiques chimiques des SLC

Le principe des SLC a été appliqué à de nombreuses catégories de composés : antitumoraux, antiviraux, stéroïdes, etc... (revue dans Bodor & Brewster, 1991). Récemment, un SLC transportant de l'oestradiol a été étudié en thérapeutique humaine où il induisait, après injection intraveineuse, une diminution dose-dépendante de la lutéotrophine chez des femmes ménopausées (Bodor & Brewster, 1991). Ces résultats sont très intéressants car ils valident le concept de ciblage vers le cerveau basé sur des transporteurs de type dihydropyridine. Cependant, ces composés ne sont pas encore administrables oralement en raison de leur instabilité.

Le SLC14, très instable, contient le type de transporteur le plus utilisé dans la littérature. Il présente un ΔlogP défavorable (Tableau 16) et s'avère effectivement inactif dans le test de l'escalier. Le SLC13 est le composé le plus stable parmi ceux que nous avons étudiés, il est notamment beaucoup plus stable à l'air que le SLC14 (Linget, 1992). De plus, il montre le ΔlogP le plus favorable, parmi les 6 SLC étudiés (Tableau 16). C'est le seul composé ayant montré une activité anxiolytique dans le test de l'escalier aux doses testées.

Le SLC13 montre cependant des effets toxiques, à des doses proches des doses efficaces. Mais, les SLC18 et 19, des molécules très proches du SLC13 montrent une toxicité beaucoup plus faible que le SLC13, le SLC18 étant d'ailleurs totalement dépourvu de toxicité aux doses testées. De plus, par voie i.p. ou p.o., la toxicité sera probablement fortement diminuée par rapport à l'administration i.v. que nous avons employée. Les problèmes de toxicité devraient donc être facilement résolus. Il est à noter que la transformation de la 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine (MPTP) en ion 1-méthyl-4-phénylpyridinium (MPP^+), un métabolite neurotoxique, impliqué dans le développement du Parkinsonisme, montre certaines ressemblances avec le concept général des SLC. De plus, les *N*-méthyltransférases, présentes notamment dans le foie et le cerveau, induisent la conversion par méthylation, de certaines pyridines présentes dans l'environnement en pyridiniums quaternaires toxiques (Ansher *et al.*, 1986). En effet, la méthylation du 4,4'-dipyridyl, une pyridine, donne naissance à 2 métabolites toxiques qui provoquent une hémorragie pulmonaire après une dose unique (dans Ansher *et al.*, 1986). Il semblerait donc que la toxicité de ces molécules soit liée à la méthylation par les méthyltransférases. Ces observations constituent une explication possible de la toxicité observée avec les SLC13 et 19.

Les résultats comportementaux obtenus avec les SLC suggèrent que les paramètres physico-chimiques définis par Linget (1992), en particulier le ΔlogP, semblent corrélables à l'activité comportementale et qu'il devrait être possible d'augmenter la stabilité des composés de type SLC tout en conservant leurs propriétés de transport de substances actives, spécifiquement vers le système nerveux central, comme l'a démontré le SLC13. L'utilisation clinique de ces substances devra obligatoirement passer par une augmentation de leur stabilité. En conséquence le développement de ces systèmes de transport devra, à l'avenir, prendre ces données en compte, afin d'obtenir des formes aisément administrables.

III. CONCLUSION GENERALE

Le but de ce travail était de tester la valeur fonctionnelle des systèmes de distribution spécifiquement cérébrale du GABA. L'efficacité de ces systèmes a été

largement étudiée sur le plan biochimique mais il restait à confirmer leur efficacité sur le plan comportemental.

Le SK&F-89976-A, inhibiteur de la recapture du GABA, est capable de traverser la BHE. Cette substance a été choisie par rapport au GABA proprement dit parce que le dosage du GABA est rendu complexe par la part endogène. Sur le plan comportemental, une augmentation du taux de GABA central que ce soit par inhibition de recapture ou par transport devrait provoquer des effets de type BZD. Ce sont ces effets que les tests, expérimentés avec le DZP et le SK&F-89976-A, ont recherché préférentiellement.

Nous avons, dans un premier temps, sélectionné quatre tests (trois tests purement comportementaux et un test plutôt neurophysiologique) et nous les avons appliqué à deux souches de rats, Wistar et Long-Evans, dont les niveaux d'activité sont très différents. L'ensemble des résultats obtenus dans ces expériences préliminaires, a permis la vérification des effets anticonvulsivants du DZP et du SK&F-89976-A, le DZP étant plus puissant que le SK&F-89976-A. Mais, le SK&F-89976-A qui semblait dépourvu d'effets secondaires observables aux doses anticonvulsivantes contrairement au DZP, a montré une activité sédative dose-dépendante dans le test de l'escalier et très peu d'activité dans le test de suppression néophobique de la prise de boisson. Cet inhibiteur de la recapture du GABA représente donc une nouvelle famille de composés anticonvulsivants mais il présente des effets sédatifs et semble dépourvu d'effets anxiolytiques.

L'activité anxiolytique des BZD dépend donc en partie du système GABAergique, mais d'autres systèmes de neurotransmetteurs doivent également intervenir. En ce qui concerne les propriétés anticonvulsivantes des BZD, nous avons mis en évidence une implication directe du GABA. En effet, nous avons montré que le SK&F-89976-A, inhibiteur de la recapture du GABA traversant la BHE, présentait comme le DZP, des propriétés anticonvulsivantes vis-à-vis du PTZ. Les propriétés anticonvulsivantes de cet inhibiteur de la recapture du GABA étaient cependant moins étendues que celle de la BZD qui était capable d'inhiber totalement les convulsions induites par le PTZ, alors que le SK&F-89976-A réduisait l'intensité des crises sans les éliminer. Le SLC13, quant à lui, a permis la mise en évidence d'effets anxiolytiques comparables à ceux du DZP.

En conclusion, il apparaît que le système GABAergique intervient à la fois dans les effets anxiolytique et anticonvulsivant des BZD, mais qu'il ne représente probablement qu'une partie des sites d'action des BZD puisque ni l'augmentation spécifiquement synaptique du taux de GABA par le SK&F-89976-A, ni l'apport de GABA exogène dans tout le SNC par l'intermédiaire de SLC, n'a permis d'obtenir la totalité des effets des BZD.

BIBLIOGRAPHIE

Aggarwal, S.K., Gogu, S.R., Rangan, S.R.S. & Agrawal, K.C. (1990) Synthesis and biological evaluation of prodrugs of zidovudine. *J. Med. Chem.*, **33** : 1505-1510.

Ågmo, A. & Giordano, M. (1985) The locomotor-reducing effects of GABAergic drugs do not depend on the $GABA_A$ receptor. *Psychopharmacology*, **87** : 51-54.

Ågmo, A., Pruneda, R., Guzmán, M. & Gutiérrez, M. (1991) GABAergic drugs and conflict behavior in the rat : lack of similarities with the actions of benzodiazepines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **344** : 314-322.

Anderson, W.R., Simpkins, J.W., Brewster, M.E. & Bodor, N. (1987a) Evidence for the reestablishment of copulatory behavior in castrated male rats with a brain-enhanced estradiol-chemical delivery system. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **27** : 265-271.

Anderson, W.R., Simpkins, J.W., Woodard, P.A., Winwood, D., Stern, W.C. & Bodor, N. (1987b) Anxiolytic activity of a brain delivery system for GABA. *Psychopharmacology*, **92** : 157-163.

Anderson, W.R., Simpkins, J.W., Brewster, M.E. & Bodor, N. (1988a) Effects of a brain-enhanced chemical delivery system for estradiol on body weight and serum hormones in middle-aged male rats. *Endocrine Res.*, **14** : 131-148.

Anderson, W.R., Simpkins, J.W., Brewster, M.E. & Bodor, N.N. (1988b) Evidence for suppression of serum LH without elevation in serum estradiol or prolactin with a brain-enhanced redox delivery system for estradiol. *Life Sci.*, **42** : 1493-1502.

Anderson, W.R., Simpkins, J.W., Brewster, M.E. & Bodor, N. (1989) Evidence for prolonged suppression of stress-induced release of adrenocorticotropic hormone and corticosterone with a brain-enhanced dexamethasone-redox delivery system. *Neuroendocrinology*, **50** : 9-16.

Anderson, W.R., Rahimy, M.H., Brewster, M.E., Bodor,N. & Simpkins, J.W. (1991) The effects of a brain-enhanced estradiol delivery system on testosterone and androgen-dependent tissues. II. The role of testosterone. *Endocrinology (Philadelphia)*, **129** : 726-733.

Ansher, S.S., Cadet, J.L., Jakoby, W.B. & Baker, J.K. (1986) Role of N-methyltransferases in the neurotoxicity associated with the metabolites of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and other 4-substituted pyridines present in the environment. *Biochem. Pharmacol.*, **35** : 3359-3363.

Assié, M.-B., Chopin, P., Palmier, C. & Briley, M. (1991) Effects of repeated administration of diazepam to rats on locomotor activity, elevated plus-maze and various brain receptors. In : *New Concepts in Anxiety*, M. Briley & S.E. File, Eds., Macmillan Press, London, pp268-276.

Barker, J.L. & McBurney, R.N. (1979) GABA and glycine may share the same conductance channel on cultured mammalian neurones. *Nature*, **277** : 234-236.

Bates, I.P. (1985) Permeability of the blood-brain barrier. *TIPS*, **6** : 447-450.

Belzung, C., Misslin, R. & Vogel, E. (1988) The benzodiazepine receptor inverse agonists β-CCM and RO 15-3505 both reverse the anxiolytic effects of ethanol in mice. *Life Sci.*, **42** : 1765-1772.

Belzung, C., Misslin, R. & Vogel, E. (1989) Behavioural effects of the benzodiazepine receptor partial agonist RO 16-6028 in mice. *Psychopharmacology*, **97** : 388-391.

Berkson, J. (1953) A statistically precise and relatively simple method of estimating the bioassay with quantal response, based on the logistic function. *J. Am. Stat. Assoc.*, **48** : 565-599.

Bhagrath, M., Sidwell, R., Czako, K., Seyda, K., Anderson, W., Bodor, N. & Brewster, M.E. (1991) Improved delivery through biological membranes. Synthesis, characterization and antiviral activity of a series of ribavirin chemical delivery systems : 5' and carboxamide derivatives. *Antivir Chem. Chemother.*, **2** : 265-286.

Biggio, G. & Costa, E., Eds. (1986) *GABAergic transmission and anxiety*, Raven Press, New York, **41** : 250p.

Blampied, N.M. & Kirk, R.C. (1983) Defensive burying : Effects of diazepam and oxprenolol measured in extinction. *Life Sci.*, **33** : 695-699.

Bodor, N. & Abdelalim, A.M. (1985) Improved delivery through biological membranes. XIX : Novel redox carriers for brain-specific chemical delivery systems. *J. Pharm. Sci.*, **74** : 241-245.

Bodor, N. & Abdelalim, A.M. (1986) Improved delivery through biological membranes. XX : Nicotinamide↔dihydronicotinamide based ester-linked redox carrier systems. *J. Pharm. Sci.*, **75** : 29-35.

Bodor, N. & Brewster, M.E. (1983a) Improved delivery through biological membranes. XV. Sustained brain delivery of berberine. *Eur. J. Med. Chem.*, **18** : 235-240.

Bodor, N. & Brewster, M.E. (1983b) Problems of delivery of drugs to the brain. *Pharmac. Ther.*, **19** : 337-386.

Bodor, N. & Brewster, M.E. (1991) Chemical delivery systems. In : *Targeting Drug Delivery*, R.L. Juliano, Ed., Springer Verlag, Berlin, pp231-284.

Bodor, N. & El-Koussi, A. (1988) Novel 'soft' β-blockers as potential safe antiglaucoma agents. *Current Eye Res.*, **7** : 369-374.

Bodor, N. & El-Koussi, A. (1992) A new ocular site-specific chemical delivery system for antiglaucoma drugs. *S.T.P. Pharma. Sciences*, **2** : 61-67.

Bodor, N. & Farag, H.H. (1983a) Improved delivery through biological membranes. 11. A redox chemical drug-delivery system and its use for brain-specific delivery of phenylethylamine. *J. Med. Chem.*, **26** : 313-318.

Bodor, N. & Farag, H.H. (1983b) Improved delivery through biological membranes. 13. Brain-specific delivery of dopamine with a dihydropyridine↔pyridinium salt type redox delivery system. *J. Med. Chem.*, **26** : 528-534.

Bodor, N. & Farag, H.H. (1984) Improved delivery through biological membranes. XIV : Brain-specific, sustained delivery of testosterone using a redox chemical delivery system. *J. Pharm. Sci.*, **73** : 385-388.

Bodor, N. & Prókai, L. (1990) Site- and stereospecific ocular drug delivery by sequential enzymatic bioactivation. *Pharm. Res.*, **7** : 723-725.

Bodor, N. & Simpkins, J.W. (1983) Redox delivery system for brain-specific, sustained release of dopamine. *Science*, **221** : 65-67.

Bodor, N. & Visor, G. (1984a) Formation of adrenaline in the iris-ciliary body from adrenalone diesters. *Exp. Eye Res.*, **38** : 621-626.

Bodor, N. & Visor, G. (1984b) Improved delivery through biological membranes. XVII. A site-specific chemical delivery system as a short-acting mydriatic agent. *Pharm. Res.*, **4** : 168-173.

Bodor, N., Shek, E. & Higuchi, T. (1975) Delivery of a quaternary pyridinium salt across the blood-brain barrier by its dihydropyridine derivative. *Science*, **190** : 155-156.

Bodor, N., Shek, E. & Higuchi, T. (1976) Improved delivery through biological membranes. 1. Synthesis and properties of 1-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime, a pro-drug of N-methylpyridinium-2-carbaldoxime chloride. *J. Med. Chem.*, **19** : 102-107.

Bodor, N., Farag, H.H. & Brewster, M.E. (1981) Site-specific, sustained release of drugs to the brain. *Science*, **214** : 1370-1372.

Bodor, N., Nakamura, T. & Brewster, M.E. (1986) Improved delivery through biological membranes. XXIII : Synthesis, distribution, and neurochemical effects of a tryptamine chemical delivery system. *Drug Des. Deliv.*, **1** : 51-64.

Bodor, N., McCornack, J. & Brewster, M.E. (1987) Improved delivery through biological membranes. XXII. Synthesis and distribution of brain-selective estrogen delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **35** : 47-59.

Bodor, N., El-Koussi, A., Kano, M. & Nakamura, T. (1988) Improved delivery through biological membranes. 26. Design, synthesis, and pharmacological activity of a novel chemical delivery system for ß-adrenergic blocking agents. *J. Med. Chem.*, **31** : 100-106.

Bodor, N., Venkatraghavan, V., Winwood, D., Estes, K. & Brewster, M.E. (1989) Improved delivery through biological membranes. XLI. Brain-enhanced delivery of chlorambucil. *Int. J. Pharm.*, **53** : 195-208.

Boix, F., Teruel, A.F. & Tobena, A. (1988) The anxiolytic action of benzodiazepines is not present in handling-habituated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **31** : 541-546.

Bormann, J. (1988) Electrophysiology of $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor subtypes. *TINS*, **11** : 112-116.

Bowery, N. (1989) $GABA_B$ receptors and their significance in mammalian pharmacology. *TIPS*, **10** : 401-407.

Bowery, N.G. (1983) Classification of GABA receptors. In : *The GABA Receptors*, S.J. Enna, Ed., The Humana Press, Clifton, New Jersey, pp177-213.

Bowery, N.G., Hill, D.R., Hudson, A.L., Doble, A., Middlemiss, D.N., Shaw, J. & Turnbull, M. (1980) (-)baclofen decreases neurotransmitter release in the mammalian CNS by an action at a novel GABA receptor. *Nature*, **283** : 92-94.

Braestrup, C. & Nielsen, M. (1981) [^{3}H]Propyl β-carboline-3-carboxylate as a selective radioligand for the BZ_1 benzodiazepine receptor subclass. *J. Neurochem.*, **37** : 333-341.

Braestrup, C., Nielsen, M. & Olsen, C.E. (1980) Urinary and brain β-carboline-3-carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77** : 2288-2292.

Braestrup, C., Schmiechen, R., Neef, C., Nielsen, M. & Petersen, E.N. (1982) Interaction of convulsive ligands with benzodiazepine receptors. *Science*, **216** : 1241-1243.

Braestrup, C., Nielsen, M. & Krogsgaard-Larsen, P. (1986) Glycine antagonists structurally related to 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[5,4-*c*]pyridin-3-ol inhibit binding of [^{3}H]strychnine to rat brain membranes. *J. Neurochem.*, **47** : 691-696.

Brewster, M.E., Estes, K.S. & Bodor, N. (1986) Improved delivery through biological membranes. XXIV : Synthesis, *in vitro* studies, and *in vivo* characterization of brain-specific and sustained progestin delivery systems. *Pharm. Res.*, **3** : 278-285.

Brewster, M.E., Estes, K.S. & Bodor, N. (1988a) Improved delivery through biological membranes. 32. Synthesis and biological activity of brain-targeted delivery systems for various estradiol derivatives. *J. Med. Chem.*, **31** : 244-249.

Brewster, M.E., Estes, K.S., Loftsson, T., Perchalski, R., Derendorf, H., Mullersman, G. & Bodor, N. (1988b) Improved delivery through biological membranes. XXXI : Solubilization and stabilization of an estradiol chemical delivery system by modified ß-cyclodextrins. *J. Pharm. Sci.*, **77** : 981-985.

Brewster, M.E., Estes, K.S., Perchalski, R. & Bodor, N. (1988c) A dihydropyridine conjugate which generates high and sustained levels of the corresponding pyridinium salt in the brain does not exhibit neurotoxicity in cynomolgus monkeys. *Neurosci. Lett.*, **87** : 277-282.

Brewster, M.E., Little, R., Venkatraghavan, V. & Bodor, N. (1988d) Brain-enhanced delivery of antiviral agents (Abstr.). *Antiviral Res.*, **9** : p127.

Brewster, M.E., Deyrup, M., Czako, K. & Bodor, N. (1990) Extension of a redox-based chemical delivery system to α,β-unsaturated ketones. *J. Med. Chem.*, **8** : 2063-2065.

Brewster, M.E., Anderson, W. & Bodor, N. (1991a) Brain, blood, and cerebrospinal fluid distribution of a zidovudine chemical delivery system in rabbits. *J. Pharm. Sci.*, **80** : 843-846.

Brewster, M.E., Deyrup, M., Seyda, K. & Bodor, N. (1991b) Synthesis, characterization and in vitro evaluation of various sulfonamide chemical delivery systems. *Int. J. Pharm.*, **68** : 215-229.

Bustany, P. (1983) La barrière hémato-encéphalique. *Pharmuka, Séminaire de Psychiatrie Biologique*, Tome **4** : 107-131.

Cananzi, A.R., Costa, E. & Guidotti, A. (1980) Potentiation by intraventricular muscimol of the anticonflict effect of benzodiazepines. *Brain Res.*, **196** : 447-453.

Canonico, P., Kende, M. & Gabrielsen, B. (1988) Carrier-mediated delivery of antiviral agents. *Adv. Virus Res.*, **35** : 271-312.

Chase, T.N. & Walters, J.R. (1976) Pharmacologic approaches to the manipulation of GABA mediated synaptic function in man. In : *GABA in Nervous System Function*, E. Roberts, T.N. Chase & D.B. Tower, Eds., Raven Press, New York, pp497-513.

Chopin, P. & Briley, M. (1987) The elevated plus-maze : a new behavioural test of anxiety. *Preclinical Strategies in Psychopharmacology*, Abstr. 5P.

Chu, C.K., Bhadti, V.S., Doshi, K.J., Etse, J.T., Gallo, J.M., Boudinot, F.D. & Schinazi, R.F. (1990) Brain targeting of anti-HIV nucleosides : Synthesis and *in vitro* and *in vivo* studies of dihydropyridine derivatives of 3'-azido-2',3'-dideoxyuridine and 3'-azido-3'-deoxythymidine. *J. Med. Chem.*, **33** : 2188-2192.

Cooper, B.R., Howard, J.L., White, H.L., Soroko, F., Ingold, K. & Maxwell, R.A. (1980) Anorexic effects of ethanolamine-o-sulfate and muscimol in the rat : Evidence that GABA inhibits ingestive behavior. *Life Sci.*, **26** : 1997-2002.

Corda, M.G. & Biggio, G. (1986) Proconflict effect of GABA receptor complex antagonists. *Neuropharmacology*, **25** : 541-544.

Corda, M.G., Sanna, E., Concas, A., Giorgi, O., Ongini, E., Nurchi, V., Pintori, T., Crisponi, G. & Biggio, G. (1986) Enhancement of γ-aminobutyric acid binding by quazepam, a benzodiazepine derivative with preferential affinity for type I benzodiazepine receptors. *J. Neurochem.*, **47** : 370-374.

Costa, E., Guidotti, A., Mao, C.C. & Suria, A. (1976) A GABA hypothesis for the action of benzodiazepines. In : *GABA in Nervous System Function*, E. Roberts, T.N. Chase. & D.B. Tower, Eds., Raven Press, New York, pp413-426.

Craft, R.M., Howard, J.L. & Pollard, G.T. (1988) Conditioned defensive burying as a model for identifying anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **30** : 775-780.

Critchley, M.A.E. & Handley, S.L. (1987) Effects in the X-maze anxiety model of agents acting at 5-HT_1 and 5-HT_2 receptors. *Psychopharmacology*, **93** : 502-506.

Croucher, M.J., Meldrum, B.S. & Krogsgaard-Larsen, P. (1983) Anticonvulsant activity of GABA uptake inhibitors and their prodrugs following central or systemic administration. *Eur. J. Pharmacol.*, **89** : 217-228.

Cutrufo, C., Bortot, L., Giachetti, A. & Manzini, S. (1992) Differential effects of various xanthines on pentylenetetrazole-induced seizures in rats : an EEG and behavioural study. *Eur. J. Pharmacol.*, **222** : 1-6.

Deyrup, M., Sidwell, R., Little, R., Druzgala, P., Bodor, N. & Brewster, M.E. (1991) Improved delivery through biological membranes. Synthesis and antiviral activity of a series of ribavirin chemical delivery systems : 2' and 3' derivatives. *Antiviral Chem. Chemother.*, **2** : 337-355.

Dietzel, K., Keuth, V., Estes, K.S.,Brewster, M.E., Clemmons, R.M., Vistelle, R., Bodor, N.S. & Derendorf, H. (1990) A redox-based system that enhances delivery of estradiol to the brain : Pharmacokinetic evaluation in the dog. *Pharm. Res.*, **7** : 879-883.

DiMicco, J.A., Alsip, N.L. & Wible, J.H.Jr (1984) Multiple roles for CNS GABA mechanisms in the autonomic regulation of cardiovascular function : pharmacological evidence. *Neuropharmacology*, **23** : 819-820.

Doble, A. & Martin, I.L. (1992) Multiple benzodiazepine receptor : no reason for anxiety. *TIPS*, **13** : 76-81.

Doteuchi, M. & Costa, E. (1973) Pentylenetetrazol convulsions and brain catecholamine turnover rate in rats and mice receiving

diphenylhydantoin or benzodiazepines. *Neuropharmacology*, **12** : 1059-1072.

Eidman, D.S., Benedito, M.A.C. & Leite, J.R. (1990) Daily changes in pentylenetetrazol-induced convulsions and open-field behavior in rats. *Physiol. Behav.*, **47** : 853-856.

El-Koussi, A. & Bodor, N. (1987) Improved delivery through biological membranes XXV. Enhanced and sustained delivery of trifluorothymidine to the brain using a dihydropyridine↔pyridinium salt type redox delivery system. *Drug Des. Deliv.*, **1** : 275-283.

El-Koussi, A. & Bodor, N. (1989) Formation of propranolol in the iris-ciliary body from its propranolol ketoxime precursor - a potential antiglaucoma drug. *Int. J. Pharm.*, **53** : 189-194.

Emmanouil, D.E. & Quock, R.M. (1990) Effects of benzodiazepine agonist, inverse agonist and antagonist drugs in the mouse staircase test. *Psychopharmacology*, **102** : 95-97.

Enna, S.J. & Möhler, H. (1987) γ-aminobutyric acid (GABA) receptors and their association with benzodiazepine binding sites. In : *Psychopharmacology : The Third Generation of Progress*, H.Y. Meltzer, Ed., Raven Press, New York, pp265-272.

Estes, K.S., Brewster, M.E., Simpkins, J.W. & Bodor, N. (1987) A novel redox system for CNS-directed delivery of estradiol causes sustained LH suppression in castrate rats. *Life Sci.*, **40** : 1327-1334.

Estes, K.S., Brewster, M.E. & Bodor, N.S. (1988) A redox system for brain targeted estrogen delivery causes chronic body weight decrease in rats. *Life Sci.*, **42** : 1077-1084.

Estes, K.S., Dewland, P.M., Brewster, M.E., Derendorf, H. & Bodor, N. (1991a) A redox-based chemical delivery system (CDS) applied to estradiol. *Pharm. Ztg. Wiss.*, **4** : 153-158.

Estes, K.S., Keuth, V., Dietzel, K., Brewster, M.E., Bodor, N.S. & Derendorf, H. (1991b) A redox-based chemical delivery system that enhances estradiol distribution to the brain : Disposition studies in the rat. *Pharm. Res.*, **8** : 1180-1185.

Falch, E., Hedegaard, A., Nielsen, L., Jensen, B.R., Hjeds, H. & Krogsgaard-Larsen, P. (1986) Comparative stereostructure-activity studies on $GABA_A$ and $GABA_B$ receptor sites and GABA uptake using rat brain membrane preparations. *J. Neurochem.*, **47** : 898-903.

Feely, M. & Pullar, T. (1990) Pharmacokinetic differences between benzodiazepines. In : *Benzodiazepines : Current Concepts*, I. Hindmarch, G. Beaumont, S. Brandon & B.E. Leonard, Eds., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp61-72.

Fernández-Guasti, A. & Hong, E. (1989) Antianxiety effect of various putative 5-HT_1 receptor agonists on the conditioned defensive burying paradigm. In : *The Behavioral Pharmacology of 5-HT*, P. Bevan & A.R. Cools, Eds., Lawrence Erlbaum, New York, pp277-382.

Fernández-Guasti, A. & López-Rubalcava, C. (1990) Evidence for the involvement of the 5-HT1A receptor in the anxiolytic action of indorenate and ipsapirone. *Psychopharmacology*, **101** : 354-358.

Fernández-Guasti, A., Hong, E. & López-Rubalcava, C. (1992) Species differences in the mechanism through which the serotonergic agonists indorenate and ipsapirone produce their anxiolytic action. *Psychopharmacology*, **107** : 61-68.

Fernández-Teruel, A., Escorihuela, R.M., Jiménez, P. & Tobeña, A. (1990) Infantile stimulation and perinatal administration of Ro 15-1788 : additive anxiety-reducing effects in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, **191** : 111-114.

Ferrero, P., Guidotti, A. & Costa, E. (1984) Increase in the B_{max} of γ-aminobutyric acid-A recognition sites in brain regions of mice receiving diazepam. *Natl. Acad. Sci. USA*, **81** : 2247-2251.

File, S.E. (1990) One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology*, **100** : 281-282.

File, S.E. & Johnston, A.L. (1987) Chronic treatment with imipramine does not reverse the effects of 3 anxiogenic compounds in a test of anxiety in the rat. *Neuropsychobiology*, **17** : 187-192.

File, S.E. & Pellow, S. (1985a) Does the benzodiazepine antagonist Ro 15-1788 reverse the actions of picrotoxin and pentylenetetrazole on social and exploratory behaviour? *Arch. Int. Pharmacodyn.*, **277** : 272-279.

File, S.E. & Pellow, S. (1985b) The effects of triazolobenzodiazepines in two animal tests of anxiety and in the holeboard. *Br. J. Pharmac.*, **86** : 729-735.

File, S.E., Greenblatt, D.J., Martin, I.L. & Brown, C. (1985) Long-lasting anticonvulsant effects of diazepam in different mouse strains : Correlations with brain concentrations and receptor occupancy. *Psychopharmacology*, **86** : 137-141.

File, S.E., Wilks, L.J. & Mabbutt, P.S. (1988) Withdrawal, tolerance and sensitization after a single dose of lorazepam. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **31** : 937-940.

File, S.E., Wilks, L.J. & Mabbutt, P.S. (1989) The role of the benzodiazepine receptor in mediating long-lasting anticonvulsant effects and the late-appearing reductions in motor activity and exploration. *Psychopharmacology*, **97** : 349-354.

Fonnum, F. (1987) Biochemistry, anatomy, and pharmacology of GABA neurons. In : *Psychopharmacology : The Third Generation of Progress*, H.Y. Meltzer, Ed., Raven Press, New York, pp173-182.

Friend, D.R. & Chang, G.W. (1984) A colon-specific drug-delivery system based on drug glycosides and the glycosidases of colonic bacteria. *J. Med. Chem.*, **27** : 261-266.

Friend, D.R. & Chang, G.W. (1985) Drug glycosides : potential prodrugs for colon-specific drug delivery. *J. Med. Chem.*, **28** : 51-57.

Gale, K. (1985) Mechanisms of seizure control mediated by γ-aminobutyric acid : role of the substantia nigra. *Fed. Proc.*, **44** : 2414-2424.

Gavish, M. & Snyder, S.H. (1981) Gamma-aminobutyric acid and benzodiazepine receptors : Copurification and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78** : 1939-1942.

Gee, K.W., Chang, W.C., Brinton, R.E. & McEwen, B.S. (1987) GABA-dependent modulation of the Cl^- ionophore by steroids in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.*, **136** : 419-423.

Ghersi-Egea, J.F., Minn, A. & Siest, G. (1988) A new aspect of the protective function of the blood-brain barrier : activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life Sci.*, **42** : 2515-2523.

Goldstein, G. & Betz, L. (1986) La barrière qui protège le cerveau. *Pour la Science*, **109** : 84-94.

Graeff, F.G., Brandão, M.L. & Audi, E.A. (1986) Role of GABA in antiaversive drug action. In : *GABA and Mood Disorders : Experimental and Clinical Research*, G. Bartholini, K.G. Lloyd & P.L. Morselli, Eds., LERS, **4**, Raven Press, New York, p101.

Gray, J.A. (1988) Behavioural and neural-system anlyses of the actions of anxiolytic drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **29** : 767-769

Gray, J.A., Quintero, S., Mellanby, J., Buckland, C., Fillenz, M. & Fung, S.C. (1984) Some biochemical, behavioural, and electrophysiological tests of the GABA hypothesis of anti-anxiety drug action. In : *Actions and interactions of GABA and Benzodiazepines*, Bowery, N.G., Ed., Raven Press, New York, pp239-262.

Griebel, G., Moreau, J.-L., Jenck, F., Martin, J.R. & Misslin, R. (1993) Some critical determinants of the behaviour of rats in the elevated plus-maze. *Behav. Processes*, **29** : 37-48.

Guidotti, A., Corda, M.G., Vaccarino, F.M. & Wise, B.C. (1984) Role of GABA-modulin and of an endogenous effector of beta-carboline binding sites in the GABA-benzodiazepine receptor interaction. In : *Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepines*, N.G. Bowery, Ed., Raven Press, New York, pp191-202.

Haefely, W.E. (1987) Structure and function of the benzodiazepine receptor. *Chimia*, **41** : 389-396.

Haefely, W.E. (1988) Benzodiazepines. *Int. Anesthe. Cli.*, **26** : 262-272.

Haefely, W. & Polc, P. (1983) Electrophysiological studies on the interaction of anxiolytic drugs with GABAergic mechanisms. In : *Anxiolytics : Neurochemical, Behavioral, and Clinical Perspectives*, J.B. Malick, S.J. Enna & H.I. Yamamura, Eds., Raven Press, New York, pp113-145.

Haefely, W., Kulcsar, A., Möhler, H., Pieri, L., Polc, P. & Schaffner, R. (1975) Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. In : *Advances in Biochemical Psychopharmacology*, E. Costa & P. Greengard, Eds., Raven Press, New York, **14** : pp131-151.

Haefely, W., Pieri, L., Polc, P. & Schaffner, R. (1981) General pharmacology and neuropharmacology of benzodiazepine derivatives. In : *Handbook of Experimental Pharmacology : Psychotropic Agents*, F. Hoffmeister & G. Stille, Eds., Springer Verlag, Berlin, **55** : pp13-262.

Hamel, E., Goetz, I.E. & Roberts, E. (1981) Glutamic acid decarboxylase and γ-aminobutyric acid in Huntington's disease fibroblasts and other cultured cells, determined by a [^{3}H]muscimol radioreceptor assay. *J. Neurochem.*, **37** : 1032-1038.

Hanada, S., Mita, T., Nishino, N. & Tanaka, C. (1987) [^{3}H]Muscimol binding sites increased in autopsied brains of chronic schizophrenics. *Life Sci.*, **40** : 259-266.

Handley, S.L. & Mithani, S. (1984) Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **327** : 1-5.

Hansch, C., Bjorkroth, J.P. & Leo, A. (1987) Hydrophobicity and central nervous system agents : On the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *J. Pharm. Sci.*, **76** : 663-687.

Harbaugh, R.E. (1989) Novel CNS-directed drug delivery systems in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Neurobiol. Aging*, **10** : 623-629.

Heit, M.C. & Schwark, W.S. (1988) Pharmacological studies with a GABA uptake inhibitor in rats with kindled seizures in the amygdala. *Neuropharmacology*, **27** : 367-374.

Hill, D.R. & Bowery, N.G. (1981) ^{3}H-baclofen and ^{3}H-GABA bind to bicuculline-insensitive $GABA_B$ sites in rat brain. *Nature*, **290** : 149-152.

Hodges, H.M. & Green, S. (1984) Evidence for the involvement of brain GABA and serotonin systems in the anticonflict effects of chlordiazepoxide in rats. *Behav. Neural Biol.*, **40** : 127-154.

Hodges, H.M., Green, S.E., Crewes, H. & Mathers, I. (1981) Effects of chronic chlordiazepoxide treatment on novel and familiar food preference in rats. *Psychopharmacology*, **75** : 311-314.

Hoehn-Saric, R. (1983) Effects of THIP on chronic anxiety. *Psychopharmacology*, **80** : 338-341.

Hornykiewicz, O., Lloyd, K.G. & Davidson, L. (1976) The GABA system, function of the basal ganglia, and Parkinson's disease. In : *GABA in Nervous System Function*, E. Roberts, T.N. Chase. & D.B. Tower, Eds., Raven Press, New York, pp479-485.

Houri, D. (1986) Effects of central acting drugs on the mirror staircase test. *Nippon Yaturigaku Zasshi*, **87** : 135-142.

Howes, J., Bodor, N., Brewster, M., Estes, K. & Eve, M. (1988) A pilot study with PR-63 in postmenopausal volunteers. *J. Clin. Pharmacol.*, **28** : p951.

Jensen, L.H. & Petersen, E.N. (1983) Bidirectional effects of benzodiazepine receptor ligands against picrotoxin- and pentylenetetrazol-induced seizures. *J. Neural Transmission*, **58** : 183-191.

Johnston, G.A.R. (1986) Multiplicity of GABA receptors. In : *Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels : Structural and Functional Properties*, R.W. Olsen & J.C. Venter, Eds. , Alan R. Liss, New York, pp57-71.

Johnston, G.A.R. & Mitchell, J.F. (1971) The effect of bicuculline, metrazol, picrotoxin and strychnine on the release of (H^3) GABA from rat brain slices. *J. Neurochem.*, **18** : 2441-2446.

Jones, B.J., Costall, B., Domeney, A.M., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Oakley, N.R. & Tyers, M.B. (1988) The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT_3-receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.*, **93** : 985-993.

Keane, P.L., Simiand, J., Morre, M. & Biziere, K. (1988) Tetrazepam : a benzodiazepine which dissociates sedation from other benzodiazepine activities. I. Psychopharmacological profile in rodents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245** : 692-698.

Kish, S.J., Shannak, K.S., Perry, T.L. & Hornykiewicz, O. (1983) Neuronal [^{3}H]benzodiazepine binding and levels of GABA, glutamate, and taurine are normal in Huntington's disease cerebellum. *J. Neurochem.*, **41** : 1495-1497.

Koella, W.P. (1981) GABA systems and behavior. In : *Amino Acid Neurotransmitters*, F.V. De Feudis & P. Mandel, Eds., Raven Press, New York, pp11-21.

Krogsgaard-Larsen, P. (1980) Inhibitors of the GABA uptake systems. *Mol. Cell. Biochem.*, **31** : 105-121.

Krogsgaard-Larsen, P., Falch, E., Larsson, O.M. & Schousboe, A. (1987) GABA uptake inhibitors : relevance to antiepileptic drug research. *Epilepsy Res.*, **1** : 77-93.

Krogsgaard-Larsen, P., Hjeds, H., Falch, E., Jørgensen, F.S. & Nielsen, L. (1988a) Recent advances in GABA agonists, antagonists and uptake inhibitors : Structure-activity relationships and therapeutic potential. In : *Advances in Drug Research*, B. Testa, Ed., Academic Press, London, **17** : pp381-456.

Krogsgaard-Larsen, P., Nielsen, L., Falch, E., Brehm, L & Jørgensen, F.S. (1988b) Molecular pharmacology of GABA and GABA synaptic mechanisms. In : *Neurotox '88 : Molecular Basis of Drug & Pesticide Action*, G.G. Lunt, Ed., Elsevier, Amsterdam, pp145-155.

Kuriyama, K. & Sze, P.Y. (1971) Blood-brain barrier to H^3-γ-aminobutyric acid in normal and amino oxyacetic acid-treated animals. *Neuropharmacology*, **10** : 103-108.

Larsson, O.M., Johnston, G.A.R. & Schousboe, A. (1983) Differences in uptake kinetics of *cis*-3-aminocyclohexane carboxylic acid into neurons and astrocytes in primary cultures. *Brain Res.*, **260** : 279-285.

Lat, J. (1965) The spontaneous exploratory reactions as tool for psychopharmacological studies. A contribution towards a theory of contradictory results in psychopharmacology. In : *Pharmacology of Conditioning, Learning and Retention. Second. Int. Pharm. Meeting*, M.Y. Mikhel'son & V.G. Longo, Eds., Pergamon Press, Oxford, **1** : pp47-66.

Lefauconnier, J.M. & Hauw, J.J. (1989) La barrière hémato-encéphalique : structure et rôle dans la diffusion des médicaments dans le système nerveux central. *La Lettre du Pharmacologue*, **3** : 278-283.

Le Fur, G., Mizoule, J., Burgevin, M.C., Ferris, O., Heaulme, M., Gauthier, A., Guérémy, C. & Uzan, A. (1981) Multiple benzodiazepine receptors : evidence of a dissociation between anticonflict and anticonvulsant properties by PK 8165 and PK 9084 (two quinoline derivatives). *Life Sci.*, **28** : 1439-1448.

Lenicque, P.M. (1982) L'acide gamma-aminobutyrique (GABA), un neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. *Le pharmacien biologiste*, tome **XVI** : 151-155.

Levin, V.A. (1980) Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.*, **23** : 682-684.

Linget, J.M. (1992) Transport de substances actives vers le cerveau par des systèmes de libération chimique. Synthèse et évaluation de transporteurs de type dihydropyridine. *Thèse de l'Université Louis Pasteur*, Strasbourg,129p.

Lippa, A.S., Klepner, C.A., Benson, D.I., Critchett, D.J., Sano, M.C. & Beer, B. (1980) The role of GABA in mediating the anticonvulsant properties of benzodiazepines. *Brain Res. Bull.*, **5** : 861-865.

Lippa, A.S., Meyerson, L.R. & Beer, B. (1982) Molecular substrates of anxiety : clues from the heterogeneity of benzodiazepine receptors. *Life Sci.*, **31** : 1409-1417.

Lister, R.G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology*, **92** : 180-185.

Little, R., Bailey, D., Brewster, M., Estes, K., Clemmons, R., Saab, A. & Bodor, N. (1990) Improved delivery through biological membranes. XXXIII. Brain-enhanced delivery of azidothymidine (AZT). *J. Biopharm. Sci.*, **1** : 1-18.

Lloyd, K.G. & Morselli, P.L. (1987) Psychopharmacology of GABAergic drugs. In : *Psychopharmacology : The Third Generation of Progress*, H.Y. Meltzer, Ed., Raven Press, New York, pp183-195.

Lloyd, K.G., Möhler, H., Heitz, Ph. & Bartholini, G. (1975) Distribution of choline acetyltransferase and glutamate decarboxylase within the substantia nigra and in other brain regions from control and parkinsonian patients. *J. Neurochem.*, **25** : 789-795.

Lloyd, K.G., Zivkovic, B., Sanger, D., Depoortere, H. & Bartholini, G. (1987) Fengabine, a novel antidepressant GABAergic agent. I. Activity in models for antidepressant drugs and psychopharmacological profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **241** : 245-250.

López-Rubalcava, C. & Fernández-Guasti, A. (1994) Noradrenaline-serotonin interactions in the anxiolytic effects of 5-HT1A agonists. *Behav. Pharmacol.*, **5** : 42-51.

López-Rubalcava, C., Saldívar, A. & Fernández-Guasti, A. (1992) Interaction of GABA and serotonin in the anxiolytic action of diazepam and serotonergic anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **43** : 433-440.

Löscher, W. (1982) Comparative assay of anticonvulsant and toxic potencies of sixteen GABAmimetic drugs. *Neuropharmacology*, **21** : 803-810.

Löscher, W. (1986a) SK&F-89976-A. *Drugs Fut.*, **11** : 36-38.

Löscher, W. (1986b) SK&F-100330-A. *Drugs Fut.*, **11** : 39-41.

Löscher, W. & Schwark, W.S. (1985) Evaluation of different GABA receptor agonists in the kindled amygdala seizure model in rats. *Exp. Neurol.*, **89** : 454-460.

Macdonald, R. & Barker, J.L. (1978a) Benzodiazepines specifically modulate GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. *Nature*, **271** : 563-564.

Macdonald, R. & Barker, J.L. (1978b) Specific antagonism of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons : A common mode of convulsant action. *Neurology*, **28** : 325-330.

Malick, J.B. & Enna, S.J. (1979) Comparative effects of benzodiazepines and non-benzodiazepine anxiolytics on biochemical and behavioral tests predictive of anxiolytic activity. *Commun. Psychopharmacol.*, **3** : 245-252.

Mamalaki, C., Stephenson, F.A. & Barnard, E.A. (1987) The $GABA_A$/benzodiazepine receptor is a heterotetramer of homologous α and β subunits. *EMBO J.*, **6** : 561-565.

Martin, I.L. (1987) The benzodiazepines and their receptors : 25 years of progress. *Neuropharmacology*, **26** : 957-970.

Matsui, Y. & Kamioka, T. (1979) Potentiation of muscimol-induced hyperactivity by benzodiazepines. *J. Pharm. Pharmacol.*, **31** : 427-428.

Matsumoto, R.R. (1989) GABA receptors : Are cellular differences reflected in function? *Brain Res. Rev.*, **14** : 203-225.

Matthews, W.D. & McCafferty, G.P. (1979) Anticonvulsant activity of muscimol against seizures induced by impairment of GABA-mediated neurotransmission. *Neuropharmacology*, **18** : 885-889.

Mereu, G.P., Fratta, W., Chessa, P. & Gessa, G.L. (1976) Voraciousness induced in cats by benzodiazepines. *Psychopharmacology*, **47** : 101-103.

Minn, A., Leininger-Muller, B., Ghersi-Egea, J.F., Suleman, G.F., Grassiot, M.C. & Siest, G. (1993) Pénétration, biotransformation de médicaments, et élimination des métabolites dans la barrière hématoencéphalique. *Circulation et Métabolisme du Cerveau*, 10 : 117-131.

Misslin, R., Ropartz, P. & Mandel, P. (1975) Etude comparée des effets du di-n-propylacétate et de l'oxazépam sur l'activité spontanée et conditionnée de la souris. *C.R. Acad. Sci. III*, **281** : 1175-1178.

Misslin, R., Hinschberger, A., Ropartz, P. & Mandel, P. (1976) Effet d'un inhibiteur irréversible (RMI 71645) de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) sur les activités spontanée et conditionnée de la souris. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **283** : 1221-1224.

Möhler, H. & Okada, T. (1977) Benzodiazepine receptor : Demonstration in the central nervous system. *Science*, **198** : 849-851.

Möhler, H., Richards, J.G. & Wu, J.Y. (1981a) Autoradiographic localization of benzodiazepine receptors in immunocytochemically identified gamma-aminobutyrergic synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78** : 1935-1938.

Möhler, H., Schoch, P., Richards, J.G., Häring, P. & Takacs, B. (1981b) Structure and location of a $GABA_A$ receptor complex in the central nervous system. *J. Recep. Res.*, **7** : 617-628.

Molinengo, L. & Ricci-Gamalero, S. (1970) The "staircase maze" and the "simple staircase" in the analysis of the psychopharmalogical action of CNS depressants. *Pharmacology*, **4** : 169-178.

Montgomery, K.C. (1955) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **48** : 254-260.

Moreau, J.-L. & Fields, H.L. (1986) Evidence for GABA involvement in midbrain control of medullary neurons that modulate nociceptive transmission. *Brain Res.*, **397** : 37-46.

Moser, P.C. (1989) An evaluation of the elevated plus-maze test using the novel anxiolytic buspirone. *Psychopharmacology*, **99** : 48-53.

Moser, P., Hibert, M., Middlemiss, D.N., Mir, A.K., Tricklebank, M.D. & Fozard, J.R. (1988) Effects of MDL 73005EF in animal models predictive of anxiolytic activity. *Br. J. Pharmacol.*, **93** : 3P.

Niemegeers, C.J.E. & Lewi, P.J. (1979) The anticonvulsant properties of anxiolytic agents. In : *Industrial Pharmacology : Anxiolytics*, S. Fielding & H. Lal, Eds., Futura, Mount Kisco, New York, **3** : pp141-158.

Oakley, N.R., Jones, B.J. & Straughan, D.W. (1984) The benzodiazepine receptor ligand CL218,872 has both anxiolytic and sedative properties in rodents. *Neuropharmacology*, **23** : 797-802.

Ogata, N., Inoue, M. & Matsuo, T. (1987) Contrasting properties of K^+ conductances induced by baclofen and γ-aminobutyric acid in slices of the guinea pig hippocampus. *Synapse*, **1** : 62-69.

Oishi, R., Suenaga, N. & Fukuda, T. (1979) Possible involvement of brainstem norepinephrine in pentylenetetrazol convulsions in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **10** : 57-61.

Olsen, R.W., Wamsley, J.K., McCabe, R.T., Randall, J.L. & Lomax, P. (1985) Benzodiazepine/γ-aminobutyric acid receptor deficit in the midbrain of the seizure-susceptible gerbil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82** : 6701-6705.

Öztas, B. & Sandalci, U. (1984) Blood-brain barrier permeability after pentylenetetrazol and electrically induced seizure. *IRCS Med. Sci.*, **12** : 488-489.

Palomino, E., Kessel, D. & Horwitz, J.P. (1989) A dihydropyridine carrier system for sustained delivery of 2',3'-dideoxynucleosides to the brain. *J. Med. Chem.*, **32** : 622-625.

Pardridge, W.M., Ed. (1991) *Peptide Drug Delivery to the Brain*, Raven Press, New York, 357p.

Paredes, R.G. & Ågmo, A. (1992) GABA and behavior : The role of receptor subtypes. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **16** : 145-170.

Patel, J.B. & Malick, J.B. (1983) Neuropharmacological profile of an anxiolytic. In : *Anxiolytics : Neurochemical, Behavioral, and Clinical Perspectives*, J.B. Malick, S.J. Enna & H.I. Yamamura, Eds., Raven Press, New York, pp173-191.

Pellow, S. (1985) Can drug effects on anxiety and convulsions be separated? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **9** : 55-73.

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

Pellow, S. & File, S.E. (1986b) Is tofisopam an atypical anxiolytic? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **10** : 221-227.

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

Peterson, G.M. (1989) Sustained and controlled release of neuroactive substances in the CNS by encapsulation into implantable polymers. *Neurobiol. Aging*, **10** : 639-640.

Petty, F. & ; Coffman, J.A. (1984) Plasma GABA : a possible indicator of altered GABA function in psychiatric illness. *Neuropharmacology*, **23** : 859-860.

Pinel, J.P.J. & Treit, D. (1978) Burying as a defensive response in rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **92** : 708-712.

Pinel, J.P.J., Treit, D. & Wilkie, D.M. (1980) Stimulus control of defensive burying in the rat. *Learn. Motiv.*, **11** : 150-163.

Piredda, S., Lim, C.R. & Gale, K. (1985) Intracerebral site of convulsant action of bicuculline. *Life Sci.*, **36** : 1295-1298.

Piredda, S., Pavlick, M. & Gale, K. (1987) Anticonvulsant effects of GABA elevation in the deep prepiriform cortex. *Epilepsy Res.*, **1** : 102-106.

Pollard, G.T. & Howard, J.L. (1986) The staircase test : some evidence of nonspecificity for anxiolytics. *Psychopharmacology*, **89** : 14-19.

Pop, E., Shek, E., Murakami, T. & Bodor, N.S. (1989a) Improved anticonvulsant activity of phenytoin by a redox brain delivery system I : Synthesis and some properties of the dihydropyridine derivatives. *J. Pharm. Sci.*, **78** : 609-616.

Pop, E., Wu, W.-M. & Bodor, N. (1989b) Chemical delivery systems for some penicillinase-resistant semisynthetic penicillins. *J. Med. Chem.*, **32** : 1789-1795

Pop, E., Wu, W.-M., Shek, E. & Bodor, N. (1989c) Brain-specific chemical delivery systems for β-lactam antibiotics. Synthesis and properties of some dihydropyridine and dihydroisoquinoline derivatives of benzylpenicillin. *J. Med. Chem.*, **32** : 1774-1781.

Pop, E., Wu, W.M., Shek, E. & Bodor, N. (1989d) Chemical delivery systems for drugs containing an amino group : Synthesis and properties of some pyridine derivatives of desipramine. *Drug Des. Deliv.*, **5** : 93-115.

Pop, E., Anderson, W., Prókai-Tátrai, K., Brewster, M.E., Fregly, M. & Bodor, N. (1990) Antihypertensive activity of redox derivatives of tryptophan. *J. Med. Chem.*, **33** : 2216-2221.

Pop, E., Brewster, M.E. & Bodor, N. (1991) Improved central nervous system delivery and activity of antiepileptic drugs. *Drugs Fut.*, **16** : 221-248.

Porsolt, R.D., Lenègre, A., Avril, I. & Doumont, G. (1988) Antagonism by exifone, a new cognitive enhancing agent, of the amnesias induced by four benzodiazepines in mice. *Psychopharmacology*, **95** : 291-297.

Poschel, B.P.H. (1971) A simple and specific screen for benzodiazepine-like drugs. *Psychopharmacologia*, **19** : 193-198.

Pruhs, R.J. & Quock, R.M. (1989) Interaction between nitrous oxide and diazepam in the mouse staircase test. *Anesth. Analg.*, **68** : 501-505.

Pruhs, R.J., Kalbfleisch, J.H. & Quock, R.M. (1988) Combination effects of chloral hydrate and nitrous oxide/oxygen in the mouse staircase test. *Anesth. Prog.*, **35** : 116-120.

Puglisi-Allegra, S. (1981) Involvement of the GABAergic system on shock-induced aggressive behavior in two strains of mice. The Psychopharmacology of aggression and social behavior, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **14** : 13-18.

Quock, R.M., Wojcechowskyj, J.A. & Emmanouil, D.E. (1987) Comparison of nitrous oxide, morphine and diazepam effects in the mouse staircase test. *Psychopharmacology*, **92** : 324-326.

Quock, R.M., Emmanouil, D.E., Vaughn, L.K. & Pruhs, R.J. (1992) Benzodiazepine receptor mediation of behavioral effects of nitrous oxide in mice. *Psychopharmacology*, **107** : 310-314.

Racagni, G. & Donoso, A.O., Eds. (1986) *GABA and endocrine function. Advances in biochemical psychopharmacology*, Raven Press, New York, **42** : 302p.

Racine, R.J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **32** : 281-294.

Raghavan, K.S., Bodor, N., Nath, C. & Shek, E. (1986) Brain specific chemical delivery system for nitrosoureas. *The Pharmacologist*, **28** : p233.

Raghavan, K.S., Shek, E. & Bodor, N. (1987) Improved delivery through biological membranes. XXX : Synthesis and biological aspects of a 1,4-dihydropyridine based chemical delivery system for brain-sustained delivery of hydroxy CCNU. *Anti-Cancer Drug Des.*, **2** : 25-36.

Raghavan, K., Loftsson, T., Brewster, M.E. & Bodor, N. (1992) Improved delivery through biological membranes. XLV. Synthesis, physical-chemical evaluation, and brain uptake studies of 2-chloroethyl nitrosourea delivery systems. *Pharm. Res.*, **9** : 743-749.

Rahimy, M.H., Anderson, W.R., Brewster, M.E., Bodor, N. & Simpkins, J.W. (1991) The effects of a brain-enhanced estradiol delivery system on testosterone and androgen-dependent tissues. I. Dose-response and time-course evaluation. *Endocrinology (Philadelphia)*, **129** : 717-725.

Rand, K.H., Bodor, N., El Koussi, A.A., Raad, I., Miyake, A., Houck, H. & Gildersleeve, N. (1986) Potential treatment of herpes simplex virus encephalitis by brain-specific delivery of trifluorothymidine using a dihydropyridine↔pyridinium salt type redox delivery system. *J. Med. Virol.*, **20** : 1-8.

Rastogi, S.K., Thyagarajan, R., Clothier, J. & ; Ticku, M.K. (1986) Effect of chronic treatment of ethanol on benzodiazepine and picrotoxin sites on the GABA receptor complex in regions of the brain of the rat. *Neuropharmacology*, **25** : 1179-1184.

Reed, D.J. (1980) Neurobiology. General principles related to epilepsy. Drug transport into the central nervous system. In : *Antiepileptic Drugs : Mechanisms of Action. Adv. Neurol.*, G.H. Glaser, J.K. Penry & D.M. Woodbury, Eds., Raven Press, New York, **27** : pp199-206.

Roberts, E. (1984) Gamma-aminobutyric acid (GABA) : From discovery to vizualisation of GABAergic neurons in the vertebrate nervous system. In : *Actions and Interactions of GABA and Benzodiazepines*, N.G. BOWERY, Ed., Raven Press, New York, pp1-25.

Roberts, E. & Kuriyama, K. (1968) Biochemical-physiological correlations in studies of the gamma-aminobutyric acid system. *Brain Res.*, **8** : 1-35.

Sanger, D.J. (1985) GABA and the behavioral effects of anxiolytic drugs. *Life Sci.*, **36** : 1503-1513.

Sawynok, J. (1986) Baclofen activates two distinct receptors in the rat spinal cord and guinea pig ileum. *Neuropharmacology*, **25** : 795-798.

Sawynok, J. & LaBella, F.S. (1982) On the involvement of GABA in the analgesia produced by baclofen, muscimol and morphine. *Neuropharmacology*, **21** : 397-403.

Schechter, P.J., Tranier, Y., Jung, M.J. & Sjoerdsma, A. (1977) Antiseizure activity of γ-acetylenic γ-aminobutyric acid : a catalytic irreversible inhibitor of γ-aminobutyric acid transaminase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **201** : 606-612.

Schmitt, M.L., Graeff, F.G. & Carobrez, A.P. (1990) Anxiolytic effect of kynurenic acid microinjected into the dorsal periaqueductal gray matter of rats placed in the elevated plus-maze test. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **23** : 677-679.

Schousboe, A., Hjeds, H., Engler, J., Krogsgaard-Larsen, P. & Wood, J.D. (1986) Tissue distribution, metabolism, anticonvulsant efficacy, and effect on brain amino acid levels of the glia-selective γ-aminobutyric acid transport inhibitor 4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo[4,5-*c*]pyridin-3-ol in mice and chicks. *J. Neurochem.*, **47** : 758-763.

Schwark, W.S. & Haluska, M. (1986) Prevention of amygdala kindling with an inhibitor of gamma-aminobutyric acid uptake. *Neurosci. Lett.*, **69** : 65-69.

Schwark, W.S. & Löscher, W. (1985) Comparison of the anticonvulsant effects of two novel GABA uptake inhibitors and diazepam in amygdaloid kindled rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **329** : 367-371.

Schwartz, R.D. (1988) The $GABA_A$ receptor-gated ion channel : biochemical and pharmacological studies of structure and function. *Biochem. Pharmacol.*, **37** : 3369-3375.

Shek, E., Higuchi, T. & Bodor, N. (1976a) Improved delivery through biological membranes. 2. Distribution, excretion and metabolism of N-methyl-1,6-dihydropyridine-2-carbaldoxime hydrochloride, a pro-drug of N-methylpyridinium-2-carbaldoxime chloride. *J. Med. Chem.*, **19** : 108-112.

Shek, E., Higuchi, T. & Bodor, N. (1976b) Improved delivery through biological membranes. 3. Delivery of N-methylpyridinium-2-carbaldoxime chloride through the blood-brain barrier in its dihydropyridine pro-drug form. *J. Med. Chem.*, **19** : 113-117.

Shek, E., Murakami, T., Nath, C., Pop, E. & Bodor, N. (1989) Improved anticonvulsant activity of phenytoin by a redox brain delivery system III : Brain uptake and pharmacological effects. *J. Pharm. Sci.*, **78** : 837-843.

Shephard, R.A. (1987) Behavioral effects of GABA agonists in relation to anxiety and benzodiazepine action. *Life Sci.*, **40** : 2429-2436.

Sieghart, W. (1989) Multiplicity of $GABA_A$-benzodiazepine receptors. *TIPS*, **10** : 407-411.

Simiand, J., Keane, P.E. & Morre, M. (1984) The staircase test in mice : A simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology*, **84** : 48-53.

Simpkins, J.W., Bodor, N. & Enz, A. (1985) Direct evidence for brain-specific release of dopamine from a redox delivery system. *J. Pharm. Sci.*, **74** : 1033-1036.

Simpkins, J.W., McCornack, J., Estes, K.S., Brewster, M.E., Shek, E. & Bodor, N. (1986) Sustained brain-specific delivery of estradiol causes long-term suppression of luteinizing hormone secretion. *J. Med. Chem.*, **29** : 1809-1812.

Simpkins, J.W., Anderson, W.R., Dawson, R., Jr., Seth, A., Brewster, M., Estes, K.S. & Bodor, N. (1988) Chronic weight loss in lean and obese rats with a brain-enhanced chemical delivery system for estradiol. *Physiol. Behav.*, **44** : 573-580.

Simpkins, J.W., Anderson, W.R., Dawson, R.Jr. & Bodor, N. (1989) Effects of a brain-enhanced chemical delivery system for estradiol on body weight and food intake in intact and ovariectomized rats. *Pharm. Res.*, **6** : 592-600.

Skerritt, J.H., Willow, M. & Johnston, G.A.R. (1982) Diazepam enhancement of low affinity GABA binding to rat brain membranes. *Neurosci. Lett.*, **29** : 63-66.

Skolnick, P., Marangos, P.J. & Paul, S.M. (1983) Role of benzodiazepine receptors in seizures. In : *Advances in Neurology : Status Epilepticus*, A.V. Delgado-Escueta, C.G. Wasterlain, D.M. Treiman & R.J. Porter, Eds., Raven Press, New York, **34** : 359-364.

Söderpalm, B. & Engel, J.A. (1989) Does the PCPA induced anticonflict effect involve activation of the $GABA_A$/benzodiazepine chloride ionophore receptor complex? *J. Neural Transm.*, **76** : 145-153.

Söderpalm, B. & Engel, J.A. (1991) Involvement of the $GABA_A$/benzodiazepine chloride ionophore receptor complex in the 5,7-DHT induced anticonflict effect. *Life Sci.*, **49** : 139-153.

Söderpalm, B., Hjorth, S. & Engel, J.A. (1989) Effects of 5-HT_{1A} receptor agonists and L-5-HTP in Montgomery's conflict test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **32** : 259-265.

Soubrié, P. & Boissier, J.R. (1972) Redressements et comportement exploratoire chez le rat. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **274** : 2534-2536.

Soubrié, P., De Angelis, L., Simon, P. & Boissier, J.R. (1976) Effet des anxiolytiques sur la prise de boisson en situation nouvelle et familière. *Psychopharmacology*, **50** : 41-45.

Soubrié, P., Thiébot, M.-H. & Simon, P. (1979) Enhanced suppressive effects of aversive events induced in rats by picrotoxin : Possibility of a GABA control on behavioral inhibition. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **10** : 463-469.

Squires, R.F. (1983) Benzodiazepine receptor multiplicity. *Neuropharmacology*, **22** : 1443-1450.

Squires, R.F. & Braestrup, C. (1977) Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature*, **266** : 732-734.

Stéru, L., Thierry, B., Chermat, R., Millet, B., Simon, P. & Porsolt, R.D. (1987) Comparing benzodiazepines using the staircase test in mice. *Psychopharmacology*, **92** : 106-109.

Swinyard, E.A. & Castellion, A.W. (1966) Anticonvulsant properties of some benzodiazepines. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **151** : 369-375.

Tallman, J.F., Paul, S.M., Skolnick, P. & Gallager, D.W. (1980) Receptors for the age of anxiety : Pharmacology of the benzodiazepines. *Science*, **207** : 274-281.

Tapia, R. (1983) γ-Aminobutyric acid : metabolism and biochemistry of synaptic transmission. In : *Handbook of Neurochemistry*, A. Lajtha, Ed., Plenum, New York, **3** : pp423-466.

Thanker, G.K., Tamminga, C.A., Alphs, L.D., Lafferman, J., Ferraro, T.N. & Hare, T.A. (1987) Brain γ-aminobutyric acid abnormality in tardive dyskinesia. Reduction in cerebrospinal fluid GABA levels and therapeutic response to GABA agonist treatment. *Arch. Gen. Psychiatry*, **44** : 522-529.

Thiébot, M.H., Soubrié, P., Simon, P. & Boissier, J.R. (1973) Dissociation de deux composantes du comportement chez le rat sous l'effet de psychotropes. *Psychopharmacologia*, **31** : 77-90.

Thiébot, M.H., Soubrié, P., Simon, P. & Boissier, J.R. (1976) Spécificité d'action des tranquillisants mineurs dans le test de l'escalier. Relation entre ces effets et leurs propriétés anxiolytiques. *J. Pharmacol.*, **7** : 87-102.

Tomaz, C., Brandao, M., Bagri, A., Carrive, P. & Schmitt, P. (1988) Flight behavior induced by microinjection of GABA antagonists into periventricular structures in detelencephalated rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **30** : 337-342.

Torrence, P.F., Kinjo, J., Lesiak, K., Balzarini, J. & De Clercq, E. (1988) AIDS dementia : synthesis and properties of a derivative of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) that may become 'locked' in the central nervous system. *FEBS Lett.*, **234** : 135-140.

Tower, D.B. (1976) GABA and seizures : clinical correlates in man. In : *GABA in Nervous System Function*, E. Roberts, T.N. Chase & D.B. Tower, Eds., Raven Press, New York, pp461-478.

Treit, D. (1985a) Animal models for the study of anti-anxiety agents : A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **9** : 203-222.

Treit, D. (1985b) The inhibitory effect of diazepam on defensive burying : Anxiolytic vs. analgesic effects. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **22** : 47-52.

Treit, D. (1987) Ro 15-1788, CGS 8216, picrotoxin and pentylenetetrazol : do they antagonize anxiolytic drug effects through an anxiogenic action? *Brain Res. Bull.*, **19** : 401-405.

Treit, D. & Fundytus, M. (1988) A comparison of buspirone and chlordiazepoxide in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **30** : 1071-1075.

Treit, D., Pinel, J.P.J. & Terlecki, L.J. (1980) Shock intensity and conditioned defensive burying in rats. *Bull. Psychonom. Soc.*, **16** : 5-7.

Treit, D., Pinel, J.P.J. & Fibiger, H.C. (1981) Conditioned defensive burying : A new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **15** : 619-626.

Treit, D., Pinel, J.P.J. & Fibiger, H.C. (1982) The inhibitory effect of diazepam on conditioned defensive burying is reversed by picrotoxin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **17** : 359-361.

Treit, D., Robinson, A., Rotzinger, S. & Pesold, C. (1993) Anxiolytic effects of serotonergic interventions in the shock-probe burying test and the elevated plus-maze test. *Behav. Brain Res.*, **54** : 23-34.

Tsuda, A., Ida, Y. & Tanaka, M. (1988) The contrasting effects of diazepam and yohimbine on conditioned defensive burying in rats. *Psychobiology*, **16** : 213-217.

Tsuda, A., Ida, Y., Nishimura, H. & Tanaka, M. (1989) Anxiogenic effects of β-CCE as measured in two different conditioning paradigms. *Psychobiology*, **17** : 202-206.

Turski, L., Stephens, D.N., Jensen, L.H., Petersen, E.N., Meldrum, B.S., Patel, S., Bondo Hansen, J., Löscher, W., Schneider, H.H. & Schmiechen, R. (1990) Anticonvulsant action of the β-carboline abecarnil : Studies in rodents and baboon, *Papio papio*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **253** : 344-352.

Uhlhaas, S., Lange, H., Wappenschmidt, J. & Olek, K. (1986) Free and conjugated CSF and plasma GABA in Huntington's chorea. *Acta Neurol. Scand.*, **74** : 261-265.

Unnerstall, J.R., Kuhar, M.J., Niehoff, D.L. & Palacios, J.M. (1981) Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of γ-aminobutyric acid (GABA) receptors : Evidence from a quantitative autoradiographic study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **218** : 797-804.

Vaccarino, F., Conti Tronconi, B.M., Panula, P., Guidotti, A. & Costa, E. (1985) GABA-modulin : A synaptosomal basic protein that differs from small myelin basic protein of rat brain. *J. Neurochem.*, **44** : 278-290.

Vaughn, L.K., Quock, R.M. & Meyer, R.A. Jr. (1987) Rearing and climbing behavior of X-linked hypophosphatemic (*Hyp*) mice. *Physiol. Behav.*, **40** : 131-134.

Venkatraghavan, V., Shek, E., Perchalski, R. & Bodor, N. (1986) Brain specific chemical delivery system for acyclovir. *The Pharmacologist*, **28** : p145.

Wachtel, H. & Andén, N.-E. (1978) Motor activity of rats following intracerebral injections of drugs influencing GABA mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **302** : 133-139.

Waddington, J.L. (1978) Behavioural evidence for GABAergic activity of the benzodiazepine flurazepam. *Eur. J. Pharmacol.*, **51** : 417-422.

Wood, J.D. & Peesker, S.J. (1975) The anticonvulsant action of GABA-elevating agents : a re-evaluation. *J. Neurochem.*, **25** : 277-282.

Wood, J.D. & Sidhu, H.S. (1986) Uptake of γ-aminobutyric acid by brain tissue preparations : A reevaluation. *J. Neurochem.*, **46** : 739-744.

Woodard, P.A., Winwood, D., Brewster, M.E., Estes, K.S. & Bodor, N. (1990) Improved delivery through biological membranes. XXI. Brain-targeted anti-convulsive agents. *Drug Des. Deliv.*, **6** : 15-28.

Woodbury, D.M. (1980) Convulsant drugs : mechanisms of action. In : *Antiepileptic Drugs : Mechanisms of Action. Adv. Neurol.*, G.H. Glaser, J.K. Penry & D.M. Woodbury, Eds., Raven Press, New York, **27** : pp249-303.

Woodbury, D.M. (1983) Experimental models of status epilepticus and mechanisms of drug action. In : *Status Epilepticus. Adv. Neurol.*, A.V. Delgado-Escueta, C.G. Wasterlain, D.M. Treiman & R.J. Porter, Eds., Raven Press, New York, **34** : pp149-160.

Wright, W.B.Jr., Brabander, H.J., Greenblatt, E.N., Day, I.P. & Hardy, R.A.Jr. (1978) Derivatives of 1,2,3,11a-tetrahydro-5*H*-pyrrolo[2,1-*c*]benzodiazepine-5,11 (10*H*)-dione as anxiolytic agents. *J. Med. Chem.*, **21** : 1087-1089.

Wright, I.K., Heaton, M., Upton, N. & Marsden, C.A. (1991) Comparison of acute and chronic treatment of diazepam and ritanserin in the elevated plus-maze model of anxiety. In : *New Concepts in Anxiety*, M. Briley & S.E. File, Eds., Macmillan Press, London, pp277-287.

Wu, W.-M., Pop, E., Shek, E. & Bodor, N. (1989) Brain-specific chemical delivery systems for β-lactam antibiotics. In vitro and in vivo studies of some dihydropyridine and dihydroisoquinoline derivatives of benzylpenicillin in rats. *J. Med. Chem.*, **32** : 1782-1788.

Wu, W.M., Pop, E., Shek, E., Clemmons, R. & Bodor, N. (1990) Brain and CSF specific chemical delivery systems for ß-lactam antibiotics. Study of two dihydropyridine derivatives of benzylpenicillin in rabbits and dogs. *Drug Des. Deliv.*, **7** : 33-43.

Young, R.C., Mitchell, R.C., Brown, T.H., Ganellin, C.R., Griffiths, R., Jones, M., Rana, K.K., Saunders, D., Smith, I.R., Sore, N.E. & Wilks, T.J. (1988) Development of a new physicochemical model for brain penetration and its application to the design of centrally acting H_2 receptor histamine antagonists. *J. Med. Chem.*, **31** : 656-671.

Yunger, L.M., Fowler, P.J., Zarevics, P. & Setler, P.E. (1984) Novel inhibitors of γ-aminobutyric acid (GABA) uptake : Anticonvulsant actions in rats and mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **228** : 109-115.

Zangrossi, H., Leite, J.R. & Graeff, F.G. (1989) Anxiolytic effect of carbamazepine measured in the elevated plus-maze. *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, **22** : 703-705.

Zorn, S.H. & Enna, S.J. (1985) GABA uptake inhibitors produce a greater antinociceptive response in the tail-immersion assay than other types of GABAergic drugs. *Life Sci.*, **37** : 1901-1912.

Zorumski, C.F. & Isenberg, K.E. (1991) Insights into the structure and function of GABA-benzodiazepine receptors : ion channels and psychiatry. *Am. J. Psychiatry*, **148** : 162-173.

BIBLIOTHÈQUE PHARMACIE NANCY INTERUNIVERSITAIRE

Nom, Prénom : H A R T M A N N Nadine

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

en "Biologie et Santé"

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 27 DEC. 1994 n°460

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

Jean Pierre FINANCE

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1
24-30, rue Lionnois B.P.3069 54013 Nancy cedex
Tél : 83 32 81 81 Fax : 83 32 95 90
Adresse électronique : _____@presn1.u-nancy.fr

Distribution cérébrale d'agents GABAergiques par des systèmes de libération chimique et conséquences comportementales.

La modulation de l'activité GABAergique présente de nombreuses applications thérapeutiques. Comme la plupart des composés GABAergiques ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique (BHE), les systèmes de libération chimique (SLC), basés sur les propriétés redox des dihydropyridines, permettent un ciblage de médicaments vers le cerveau. L'objectif de ce travail était d'étudier différents transporteurs de type SLC couplés à des agents GABAergiques, sur le plan comportemental, physico-chimique et cinétique. Nous avons étudié les effets comportementaux produits par une modification de l'activité GABAergique induite soit par des GABA-SLC, soit par un agent GABAergique traversant la BHE, le SK&F-89976-A, soit par une benzodiazépine (BZD), le diazépam. Ce travail a permis de montrer que l'élévation du taux central de GABA reproduit certains effets comportementaux des BZD, mais que le système GABAergique ne constitue probablement pas le seul site d'action des BZD. L'analyse par rapport aux caractéristiques physico-chimiques des molécules de SLC suggère qu'il est possible d'améliorer leur stabilité, ce qui devrait permettre l'élaboration de composés actifs par voie orale. L'étude des cinétiques de distribution des SLC a nécessité la mise au point d'une méthode de détection des SLC par HPLC, dont les résultats sont également rapportés.

Cerebral distribution of GABAergic agents by chemical delivery systems and behavioural consequences.

Modulation of GABAergic activity has numerous clinical applications . However, most GABAergic compounds cannot cross the blood-brain barrier (BBB). Chemical delivery systems (CDS), based on the redox properties of dihydropyridines, can achieve the targeting of drugs to the brain. The purpose of this work was to evaluate different SLC-type carriers coupled to GABAergic agents on the behavioural, physico-chemical and kinetic levels. We studied the behavioural effects produced by changes in GABAergic activity induced whether by different GABA-CDS, by SK&F-89976-A, a GABAergic agent crossing the BBB, or by a benzodiazepine (BZD), diazepam. This work allowed to show that increase in GABA central levels reproduces some of the behavioural effects of BZD, but also that the GABAergic system is probably not the only one site of action of BZD. Analysis in relation to physico-chemical properties of CDS molecules suggest that it is possible to improve their stability, which would allow the development of orally active compounds. The kinetic distribution has required the development of a HPLC method for detection of the CDS, whose results are reported.