



Cibles sérotoninergiques et non sérotoninergiques des ISRS : approches pharmacologique et génétique in vivo chez la souris

Thanh Hai Nguyen

► To cite this version:

Thanh Hai Nguyen. Cibles sérotoninergiques et non sérotoninergiques des ISRS : approches pharmacologique et génétique in vivo chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114833 . tel-00663312

HAL Id: tel-00663312

<https://theses.hal.science/tel-00663312>

Submitted on 26 Jan 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

ECOLE DOCTORALE :

INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL A L'APPLIQUÉ

PÔLE : PHARMACOLOGIE ET TOXICOLOGIE

DISCIPLINE :

Neuropharmacologie

ANNÉE 2010 - 2011

SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 30 novembre 2011

Par

Thanh Hai NGUYEN

**Cibles sérotoninergiques et non sérotoninergiques des ISRS :
Approches Pharmacologique et Génétique *in vivo* chez la souris**

Directeur de thèse : Pr Alain GARDIER

Co-directeur de thèse : Dr Bruno GUIARD

Rapporteurs : Pr Michel BOULOUARD (Université de Caen)

Dr Nasser HADDJERI (Université de Lyon)

Membres du jury : Pr Catherine MARCHAND LEROUX (Université de Paris 5)

Dr Alain GOBERT (Laboratoires Servier)

Dr Bruno GUIARD (Université Paris-sud 11)

Pr Alain GARDIER (Université Paris-sud 11)

DEDICACE

A MA MERE

A MA FEMME

A MA FILLE

REMERCIEMENTS

Parce que sans vous, rien n'est possible !

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire de Neuropharmacologie-EA3544 de la faculté de pharmacie de Chatenay Malabry à l'Université de Paris Sud XI sous la co-direction du **Professeur Alain GARDIER** et du **Docteur Bruno GUIARD**.

Je tiens à exprimer ma très vive reconnaissance au **Professeur Alain GARDIER** pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, me permettant ainsi d'effectuer ce travail de recherche dans les meilleures conditions. Je le remercie également d'avoir accepté la direction de ces travaux durant lesquels il m'a offert sa confiance, son soutien et ses conseils, tout en restant l'exemple absolu du travailleur infatigable, avec un sens aigu pour le détail, ce qui m'a toujours motivé pendant ce projet.

J'adresse ma profonde gratitude au **Docteur Bruno GUIARD** qui m'a encouragé dans cette voie scientifique et qui m'a ainsi encadré pendant ma formation de haut niveau depuis mes premiers pas dans la recherche. Merci de m'avoir transmis de nouveaux principes scientifiques fondés sur une base de créativité, de rigueur et de motivation. J'ai beaucoup apprécié son esprit ouvert aux nouvelles initiatives, ce qui traduit ainsi sa vision sur la formation d'un chercheur et sa capacité à devenir autonome. J'espère pouvoir poursuivre ce qu'il m'a enseigné dans le cadre de ma recherche au Vietnam, à l'Université de Pharmacie de Hanoï. Merci pour toute sa confiance, ainsi que pour ses conseils sur le plan professionnel et personnel.

Je remercie Monsieur le **Docteur Michel BOULOUARD**, Professeur des universités (Université de Caen Basse-Normandie) ; Monsieur le **Docteur Nasser HADDJERI**, Chargé de recherche à l'INSERM U512 (Université Claude Bernard Lyon 1, France) qui ont accepté d'évaluer et de juger ce manuscrit en qualité de rapporteurs et experts des travaux neuropsychopharmacologiques réalisés chez le Rongeur.

Je remercie également, Monsieur le **Docteur Alain GOBERT**, Responsable de l'Institut de Recherches Servier et Madame le **Professeur Catherine MARCHAND-LEROUX**, Responsable de l'EA 4475 (Université Paris 5 Descartes) qui me font l'honneur de juger mon travail de doctorant en tant que spécialistes de neuropharmacologie expérimentale.

Je tiens à remercier **Thu Thuy**, ma femme merveilleuse, pour s'être occupée de notre amour, la petite princesse **Thao Vy** au cours de ces dernières années. Ce travail, c'est la liberté que tu m'as offerte qui m'a permis de le concrétiser. Maintenant, je voudrais rentrer chez nous et j'essaierai de t'épauler aussi bien que tu l'as fait pour moi !

Mes remerciements les plus chaleureux sont dédiés à tous (tes) mes amis (es) qui, au cours de ces années, m'ont stimulé et aidé dans une ambiance très agréable. Un remerciement tout particulier aux collègues du Laboratoire de Neuropharmacologie-EA 3544: **Docteur Denis David, Docteur Jean Philippe Guilloux, Docteur Thierry Deltheil, Docteur Quentin Rainer, Professeur François Coudoré, Gaël Quesseveur, Sophie Orvöen, Guillaume Hache, Yannick Le Dantec, Lin Xia, Christelle Répérent, Isabelle Seif et Louise Huchard**. Merci à vous tous, car vous avez modelé mon esprit et mon caractère pendant ces quatre années en France.

Merci enfin au personnel du Service Commun de l'Animalerie de la faculté qui, au cours de ces années, a tout mis en œuvre pour le bien-être des (malheureuses !) Souris.

PUBLICATIONS

GUILLOUX JP, DAVID DJP, XIA L, NGUYEN TH, REINER Q, GUIARD BP, REPERANT C, DELTHEIL T, TOTH M, HEN R, GARDIER AM. Characterization of 5-HT_{1A/1B} -/- mice: a new animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology* 2011, 61(3):478-88. ARTICLE 1.

RICHARDSON-JONES JW, CRAIGE CP, NGUYEN TH, KUNG HF, GARDIER AM, DRANOVSKY A, DAVID DJ, GUIARD BP, BECK SG, HEN R, LEONARDO ED. Serotonin-1A autoreceptors are necessary and sufficient for the normal formation of circuits underlying innate anxiety. *The journal of Neuroscience*. 2011, 31(16): 6008-18. ARTICLE 2.

QUESSEVEUR G*, NGUYEN TH*, DAVID I, XIA L, GARDIER AM, GUILLOUX JP, DAVID DJP, GUIARD BP. Importance of 5-HT_{1A} auto- and 5-HT_{2A} hetero-receptors interaction in the maintenance of a negative feedback on the serotonergic system. *En préparation*. ARTICLE 3.

RAINER Q*, NGUYEN TH*, QUESSEVEUR G, GARDIER AM, DAVID DJ, GUIARD BP. Functional status of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor after chronic treatment with fluoxetine in a mouse model of anxiety/depression. *Molecular Pharmacology*. ARTICLE 4.

NGUYEN TH, GUIARD BP, BACQ A, DAVID DJ, DAVID I, QUESSEVEUR G, GAUTRON S, SANCHE C, GARDIER AM. Blockade of the high-affinity norepinephrine transporter (NET) by the selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram: an in vivo microdialysis study in mice. *BJP*. ARTICLE 5.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

NGUYEN TH, GUIARD BP, REPERANT C, DAVID D.J.D, SANCHEZ C, GARDIER AM. Effects of chronic treatment with escitalopram on extracellular serotonin, norepinephrine and dopamine levels in the frontal cortex of freely moving Swiss mice: an in vivo microdialysis study. *39th Annual Meeting Soc. Neurosci* 2009, Chicago.

GUIARD BP, **NGUYEN TH**, XIA L, RAINER Q, DAVID DJ, GUILLOUX JP, GARDIER AM. Evidence of the involvement of 5-HT₂ receptor on SSRI-induced inhibition of dorsal Raphe 5-HT neurons firing rate in double 5-HT_{1A/1B} receptor knockout mice. *27th Annual Meeting of International College of Neuro-Psychopharmacology*. 2010, Hong-Kong.

NGUYEN TH, GUIARD BP, QUESSEVEUR G, DAVID DJ, GARDIER AM. Effets de l'administration d'une dose unique de escitalopram sur les concentrations extracellulaires de 5-HT et de NA dans le cortex frontal chez la souris WT et KO SERT. *10^{ème} Journées de l'Ecole Doctorale-ED425, Université de Paris Sud 11*. 2010, Orsay.

NGUYEN TH, GUIARD BP, BACQ A, DAVID D.J.D, DAVID I, QUESSEVEUR G, GAUTRON S, SANCHEZ C, GARDIER AM. Effets de l'administration d'escitalopram sur les concentrations de sérotonine [5-HT]_{ext} et de noradrénamine [NE]_{ext} dans le cortex frontal chez la souris. *11^{ème} Journées de l'Ecole Doctorale-ED425, Université de Paris Sud 11*. 2011, Chatenay Malabry.

SOMMAIRE

DEDICACES	2
REMERCIEMENTS	3
LISTE DES PUBLICATIONS	5
LISTE DES COMMUNICATIONS AFFICHEES	6
SOMMAIRE	7
ABREVIATIONS	10
INDEX DES TABLEAUX	11
INDEX DES FIGURES	12
<u>INTRODUCTION ET OBJECTIFS</u>	13

RAPPELS BIOGRAPHIQUES **18**

A. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE ET LES ELEMENTS CLES DE LA REPONSE AUX ISRS **19**

1. La sérotonine : synthèse, libération, inactivation, localisation et rôle physiologique **19**

2. Les récepteurs de la sérotonine : classification et rôles **21**

2.1. Les autorécepteurs 5-HT_{1A} **23**

1) Distribution **23**

2) Couplage et propriétés électrophysiologiques des récepteurs 5-HT_{1A} **24**

3) Expression des récepteurs 5-HT_{1A} chez les patients dépressifs **25**

4) Régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A} **27**

5) Dichotomie de réponse aux ISRS des récepteurs 5-HT_{1A} pré- et post-synaptiques **29**

6) Les récepteurs 5-HT_{1A} dans les troubles anxio/dépressifs **30**

2.2. Les hétérorécepteurs 5-HT_{2A} **32**

1) Distribution **32**

2) Couplage des récepteurs 5-HT_{2A} **32**

3) Polymorphisme du récepteur 5-HT_{2A} (rôle dans la dépression et la réponse aux ISRS) **33**

4) Les récepteurs 5-HT_{2A} dans les troubles anxio/dépressifs **34**

a) Etudes comportementales **34**

b) Rétrocontrôle du système sérotoninergique par les hétérorécepteurs 5-HT_{2A} **35**

2.3. Les hétérorécepteurs 5-HT_{2C} **37**

1) Variations génétiques du récepteur 5-HT_{2C} **37**

2) Distribution **38**

3) Couplage des récepteurs 5-HT_{2C} **39**

4) Les récepteurs 5-HT_{2C} dans les troubles anxio/dépressif **39**

a) Etudes comportementales **39**

b) Rétrocontrôle du système sérotoninergique par les hétérorécepteurs 5-HT_{2C} **40**

3. Le transporteur de la sérotonine	42
3.1. <i>Structure et fonctionnement du transporteur de la sérotonine</i>	42
3.2. <i>Distribution dans le système nerveux central</i>	43
3.3. <i>Pharmacologie du transporteur de la sérotonine</i>	44
3.4. <i>Souris génétiquement modifiées pour le SERT : études de pharmacogénétiques</i>	45
3.5. <i>Les autres moyens de transport de la sérotonine</i>	46
1) <i>La recapture hétérologue</i>	46
2) <i>La recapture de la 5-HT par les OCT ou les PMAT</i>	47
B. LA DEPRESSION MAJEURE ET TRAITEMENTS	49
1. Les symptômes de la dépression majeure	49
2. Hypothèses neurobiologiques de la dépression	50
2.1. <i>Hypothèse monoaminergique</i>	50
2.2. <i>Hypothèse moléculaire et cellulaire de la dépression</i>	52
2.3. <i>Hypothèses endocrinienne de la dépression</i>	53
3. Les traitements des troubles de l'humeur	54
3.1. <i>Classification des antidépresseurs</i>	54
3.2. <i>Mécanisme d'action des antidépresseurs monoaminergiques</i>	57
3.3. <i>Les Inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS)</i>	59
1) <i>Administration unique</i>	59
2) <i>Administration chronique</i>	61
3) <i>L'exemple particulier du Escitalopram</i>	64
a) <i>Propriétés pharmacologiques pré-cliniques du escitalopram</i>	64
b) <i>Propriétés pharmacologiques cliniques du escitalopram</i>	69
3.4. <i>Stratégies d'augmentation des effets en clinique</i>	72
1) <i>ISRS et antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (Pindolol)</i>	72
2) <i>ISRS et antipsychotiques</i>	80
C. LE SYSTEME NORADRENERGIQUE ET SON INTERACTION AVEC LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE	83
1. Le système noradrénergique	83
2. L'interaction entre le système serotoninergique et le système noradrénergique	85
2.1. <i>Effet de la NA sur le système 5-HT</i>	85
2.2. <i>Effet de la 5-HT sur le système NA</i>	86
3. Impact des ISRS sur le système noradrénergique	89
<u>En conclusion</u>	90

<u>MATERIEL ET METHODES</u>	91
1. Animaux	92
2. Microdialyse intracérébrale <i>in vivo</i> chez la souris éveillée, libre de ses mouvements	93
2.1. Principe	93
2.2. Chirurgie de l'implantation des sondes de microdialyse	95
2.3. Microdialyse intracérébrale	96
1) Microdialyse conventionnelle	96
2) Injection locale au niveau de structures cérébrales (Reverse dialysis)	97
2.4. Histologie cérébrale : vérification de l'implantation de la membrane de microdialyse	98
2.5. Dosage des neurotransmetteurs dans les dialysats par CLHP	99
1) Dosage de la 5-HT et de la DA	99
2) Dosage de la NA	100
2.6. Principaux avantages et inconvénients de la technique de microdialyse	101
3. Electrophysiologie intracérébrale <i>in vivo</i> sur chez la souris anesthésiée	102
3.1. Principe	102
3.2. Enregistrement extracellulaire des neurones sérotoninergique du raphé dorsal	103
3.3. Principaux avantages et inconvénients de la technique d'électrophysiologie	105
4. Tests comportementaux prédictif de l'activité de type-antidépresseur d'une molécule chez la souris	106
Le test de la nage forcée (FST)	106
5. Mesure <i>ex vivo</i> de l'activité de recapture des monoamines	107
5.1. Principe	107
5.2. Capture « ou uptake » des monoamines	109
<u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	110
ARTICLE 1 : SOURIS KO 5-HT _{1A1B}	111
ARTICLE 2 : SOURIS AUTO KO 5-HT _{1A}	123
ARTICLE 3 : SOURIS KO 5-HT _{2A} ET 5-HT _{1A}	135
ARTICLE 4 : SOURIS CORT ET 5-HT _{1A}	150
ARTICLE 5 : ESCITALOPRAM ET SYSTEME NORADRENERGIQUE	163
<u>DISCUSSION GENERALE</u>	186
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	200

ABBREVIATIONS

5,7-DHT : 5,7-dihydroxytryptamine

5-HT : Sérotonine

5-HIAA : Acide 5-hydroxyindol-acétique

5-HT_{1A/2A/2C} : Sous-type 1A, 2A, 2C des récepteurs de la sérotonine.

AC : Adenylate cyclase

ACTH : Adrénocorticotrophine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN(m) : Acide ribonucléique messenger

ASC : Aire sous la courbe

ATV : Aire tegmentale ventrale

BDNF : Brain derived neurotrophic factor

CFx : Cortex frontal

CLHP : Chromatographie liquide haute performance

CRF : Cortico-releasing factor

CRH : Cortico-releasing hormone

CYP 450: Cytochrome P450

DA : Dopamine

DAT: Transporteur de la dopamine

FST : Forced swimming test

EPM: Elevated Plus Maze

HPA: Hypothalamus pituitary adrenal

IMAO: Inhibiteurs de la monoamineoxydase

I.P. : Intrapéritonéale

IP3 : Inositol triphosphate

IRN : Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la noradrénaline

IRND : Inhibiteurs de la recapture de la noradrénaline et de la dopamine

IRNS : Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

IRSND : Inhibiteurs triples de la recapture de la sérotonine, de la noradrénaline et de la dopamine

IRNS : Inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline

IRSND : Inhibiteurs triples de la recapture de la sérotonine, de la noradrénaline et de la dopamine

ISRS : : Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine

GABA: Acide gamma aminobutyrique

KO : Knock-out

LC : Locus coeruleus

LCR: Liquide céphalo-rachidien

NA : Noradrénaline

NAT : Transporteur de la noradrénaline

NRD : Noyau du raphé dorsal

NSF : Novelty suppressed feeding

OCT : Organic cation transporter

OF : Open field

p-CPA : parachlorophenylalanine

PET : Tomographie par émission de positons

PLC : Phospholipase C

PMAT : Plasma membrane monoamine transporter

SERT : Transporteur de la sérotonine

SNC : Système nerveux central

TPH : Tryptophane hydroxylase

TTX : Tétrodotoxine

TCA : Tricycliques

µl : Microlitre

VMAT : Vesicular monoamine transporter

INDEX DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Classification des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂
- Tableau 2** : Classification des récepteurs 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇
- Tableau 3** : Expression des récepteurs 5-HT_{1A} chez des patients dépressifs
- Tableau 4** : Relation entre le polymorphisme 1019C/G du gène codant pour le récepteur 5-HT_{1A} et la réponse aux ISRS.
- Tableau 5** : Etudes pharmacogénétiques sur l'association entre le polymorphisme du récepteur 5-HT_{2A} et la réponse aux ISRS.
- Tableau 6** : Diagnostic de la dépression selon le DSM IV
- Tableau 7** : Principaux symptômes caractérisant une dépression mélancolique ou atypique
- Tableau 8** : Principaux éléments impliqués dans la régulation du système sérotoninergique dont le polymorphisme module l'activité thérapeutiques des ISRS
- Tableau 9** : Classification des antidépresseurs ayant la propriété de bloquer un ou plusieurs transporteurs monoaminergiques, selon leur affinité pour ces transporteurs mesurée *in vitro*
- Tableau 10** : Augmentation des [5-HT]_{ext} dans le noyau du raphé dorsal après administration aigue d'ISRS chez le rongeur.
- Tableau 11** : Augmentation des [5-HT]_{ext} dans le cortex frontal après administration aigue d'ISRS chez le rongeur.
- Tableau 12** : Inhibition de la décharge électrique des neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal après administration aigue d'ISRS chez le rongeur.
- Tableau 13** : Effets de l'administration d'ISRS sur les trois monoamines déterminés par la technique de microdialyse intracérébrale *in vivo* chez les Rongeurs.
- Tableau 14** : Inhibition de la décharge électrique des neurones 5-HT du NRD après administration chronique de citalopram ou escitalopram chez le rat et la souris.
- Tableau 15** : Améliorations cliniques nécessaires pour le développement de nouvelles thérapeutiques
- Tableau 16** : Récapitulatif des essais cliniques évaluant les effets de la co-administration ISRS / pindolol versus ISRS seul
- Tableau 17** : Potentialisation des effets des ISRS par le pindolol : principales études neurochimiques
- Tableau 18** : Effets des antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} en co-administration avec des ISRS sur l'activité électrique des neurones sérotoninergique chez le Rat anesthésié.
- Tableau 19** : Potentialisation des effets des ISRS par le pindolol : rappel des études comportementales dans le test de la nage forcée
- Tableau 20** : Constantes d'affinité (K_i, nM) des principaux antipsychotiques typiques et atypiques
- Tableau 21** : Effets précliniques et cliniques de la combinaisons d'un ISRS avec un antipsychotique atypique.
- Tableau 22** : Les souris utilisées dans cette étude
- Tableau 23** : Coordonnées stéréotaxiques des principales régions monoaminergiques étudiées chez la Souris.
- Tableau 24** : Composition du liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel
- Tableau 25** : Composition de la phase mobile permettant le dosage de la 5-HT et DA
- Tableau 26** : Composition de la phase mobile permettant le dosage de la NA
- Tableau 27** : Des avantages et inconvénients de la technique de microdialyse
- Tableau 28** : Des avantages et inconvénients de la technique d'électrophysiologie

INDEX DES FIGURES

- Figure 1** : Rétrocontrôles inhibiteurs sur les neurones sérotoninergiques
- Figure 2** : Voies de biosynthèse et d'inactivation de la sérotonine
- Figure 3** : Récepteur 5-HT_{1A} et voies de signalisation
- Figure 4** : Régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}
- Figure 5** : Schéma représentant un récepteur 5-HT_{2A}.
- Figure 6** : Structure et édition de l'ARN du récepteur 5-HT_{2C}
- Figure 7** : Structure du gène codant pour le transporteur de la sérotonine humain
- Figure 8** : Différents systèmes de recapture de la sérotonine par le SERT, le NAT/DAT et les OCT/PMAT.
- Figure 9** : Mécanismes d'action des antidépresseurs sur la neurotransmission synaptique
- Figure 10** : Mécanisme d'action pré-synaptique des ISRS
- Figure 11** : les énantiomères S et R du citalopram.
- Figure 12** : Modélisation du transporteur humain de la 5-HT, protéine transmembranaire avec les deux sites de reconnaissance des IRSS.
- Figure 13** : Sélectivité des ISRS pour les sites de liaison des transporteurs de la 5-HT versus NA et DA.
- Figure 14** : Schéma des différentes projections noradrénergiques dans le système nerveux central chez l'Homme.
- Figure 15** : Influence des neurones sérotoninergiques sur l'activité de neurones noradrénergiques dans le locus coeruleus
- Figure 16** : Schéma des modalités d'interactions possibles entre les neurones monoaminergiques centraux au niveau des corps cellulaires
- Figure 17** : Principe de fonctionnement d'une sonde de microdialyse intracérébrale.
- Figure 18** : Descriptions des repères anatomiques nécessaires à l'implantation correcte des sondes de microdialyse.
- Figure 19** : Schéma représentant une expérience de microdialyse intracérébrale in vivo chez la souris éveillée libre de ses mouvements.
- Figure 20** : Superposition d'une photo numérique d'une coupe de cerveau (à gauche) et d'une coupe de l'atlas stéréotaxique (à droite) correspondant à l'hippocampe de souris. La flèche noire indique l'extrémité de la sonde de microdialyse.
- Figure 21** : Schéma d'un potentiel d'action d'un neurone 5-HT du détecté l'aide d'une enregistrement extracellulaire au niveau de la région des corps cellulaires situés dans le noyau du raphé dorsal.
- Figure 22** : Exemple d'enregistrement d'un neurone sérotoninergique.
- Figure 23** : Test de la nage forcée chez la Souris.
- Figure 24** : Schéma représentant un protocole pour mesurer de l'activité de capture des monoamines
- Figure 25** : Contrôle de l'activité des neurones sérotoninergiques par les auto-récepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}
- Figure 26** : Contrôle de l'activité des neurones sérotoninergiques par les hétéro-récepteurs inhibiteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}
- Figure 27** : Les cibles sérotoninergiques/non sérotoninergiques impliqués dans les effets des ISRS dont le escitalopram

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

La dépression est une pathologie avec une forte prévalence. En effet, 17 à 19% de la population, rapport de risque femme/homme 2:1, souffrent ou souffriront de ce trouble de l'humeur au cours de leur vie (Hamilton, 1960; Kessler, 2003). En raison des conséquences, parfois dramatiques, d'un épisode dépressif sur la vie sociale, familiale et professionnelle des patients, une prise en charge médicale à long terme s'avère indispensable (Aina et Susman, 2006). Malgré les progrès de la recherche en psychiatrie, les principales causes de la dépression ne sont toujours pas clairement identifiées. La mise en évidence du mécanisme d'action des premiers traitements pharmacologiques de la dépression avec les antidépresseurs tricycliques (imipramine), découverts dans les années 50-60, a conduit à l'hypothèse selon laquelle un déficit de neurotransmission monoaminergique (sérotonine : 5-HT, noradrénaline : NA et/ou dopamine : DA) serait à l'origine des troubles dépressifs (Delgado et al., 1999 ; Pacher et al., 2004).

Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) font aujourd'hui partie des traitements les plus utilisés en psychiatrie pour lutter contre les troubles de l'humeur. Les molécules « block-busters » en France sont la fluoxétine (Prozac[®]), la paroxétine (Deroxat[®]) et le citalopram (Seropram[®]). Leur mécanisme d'action repose sur l'augmentation des concentrations intrasynaptiques de 5-HT consécutive au blocage sélectif de son transporteur de haute affinité également appelé SERT. Le dernier antidépresseur appartenant à la classe des ISRS, le escitalopram (Seroplex[®]) correspond à l'énantiomère actif (S-citalopram) du citalopram qui est lui-même le mélange racémique des deux énantiomères (S et R-citalopram). En raison de ce raffinement, de nombreux espoirs ont été fondés sur cette molécule quant à son efficacité thérapeutique. En effet, les ISRS provoquent des effets neurochimiques immédiats, mais plusieurs semaines sont nécessaires pour que les symptômes de la maladie commencent à être corrigés chez les patients dépressifs. Différentes méta-analyses proposent une amélioration significative du taux de rémission et du délai d'action avec le escitalopram comparé aux autres ISRS (Montgomery et al., 2011). En dépit de ces résultats et des nombreuses études portant sur la description des propriétés pharmacologiques des ISRS, le mécanisme d'action du escitalopram reste peu connu (voir partie B 3.3).

Il a été proposé que le délai d'action des antidépresseurs sérotoninergiques serait corrélé à une suractivation des autorécepteurs somatodendritiques (5-HT_{1A}) et terminaux (5-HT_{1B}) situés sur les neurones sérotoninergiques (**Figure 1**) (Gardier et al., 1996). Leur rôle étant de freiner respectivement l'activité électrique et la libération de 5-HT dans les régions cérébrales impliquées dans la dépression (cortex frontal, hippocampe). Ainsi, la présence de ces autorécepteurs semblent limiter la capacité des ISRS à augmenter les concentrations extracellulaires de 5-HT ([5-HT]_{ext}), notamment dans les premiers jours de traitement. En revanche, les effets neurochimiques des ISRS sont renforcés par l'inactivation génétique ou pharmacologique des récepteurs 5-HT_{1A} et/ou 5-HT_{1B}, ce qui met en lumière l'importance de leur blocage dans la manifestation des effets thérapeutiques des ISRS (El Mansari et Blier, 1996 ; Blier, 2001). En accord avec cette hypothèse, des études précliniques menées chez le rongeur rapportent une désensibilisation progressive des autorécepteurs 5-HT_{1A} après traitement chronique par le escitalopram chez le rongeur (Guiard et al., 2011). En dépit de ces résultats, il est possible que d'autres mécanismes, indépendant de la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A}, interviennent dans le mécanisme d'action des ISRS et plus particulièrement du escitalopram. En effet, il semblerait que des récepteurs sérotoninergiques situés sur d'autres populations neuronales (hétérorécepteurs, Spindelegger et al., 2009) participent également, de manière indirecte, à la régulation du système sérotoninergique central et donc à la modulation des effets des ISRS.

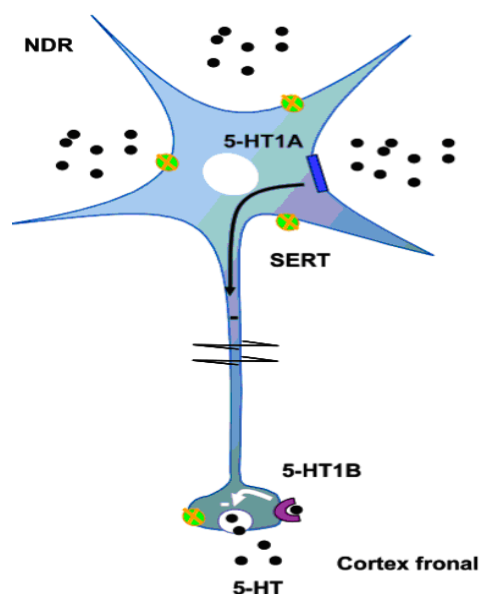


Figure 1 : Rétrocontrôles inhibiteurs sur les neurones sérotoninergiques.

Le blocage des transporteurs SERT augmentent les [5-HT]_{ext} dans les terminaisons neuronales situées, dans le cortex frontal mais aussi autour des corps cellulaires dans le noyau du raphé dorsal. L'accumulation de la 5-HT endogène provoque la stimulation d'autorécepteurs inhibiteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} freinant la libération de 5-HT. Ces mécanismes de rétrocontrôles expliqueraient l'augmentation modérée des [5-HT]_{ext} observée après l'administration unique d'ISRS (D'après Gardier et al., 1996).

● Au niveau somatodendritique, des études récentes montrent que des agonistes des récepteurs 5-HT_{2A} (Boothman et Sharp, 2005) ou 5-HT_{2C} (Quérée et al., 2009) réduisent le taux de décharge des neurones du raphé confirmant le rôle de ces hétérorécepteurs dans le contrôle de l'activité sérotoninergique. D'ailleurs, des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} ou 5-HT_{2C} tels que le MDL100907 ou le SB242084, potentialisent la capacité des ISRS à augmenter les concentrations extracellulaires de 5-HT dans le cortex frontal chez le rat (Cremers et al., 2004 ; Cremers et al., 2007 ; Sotty et al., 2009 ; Calcagno et al., 2010). Les mécanismes et les régions cérébrales impliqués dans cette "hétérorégulation" du système sérotoninergique font l'objet d'une attention particulière et ouvrent la perspective d'un développement de nouveaux antidépresseurs ciblant les récepteurs 5-HT_{2A} et/ou 5-HT_{2C}. L'implication des systèmes noradrénergique et dopaminergique centraux dans les effets de ces hétérorécepteurs sur le système 5-HT est fortement suggérée dans la mesure où ils entretiennent des liens anatomiques et fonctionnels étroits avec les neurones du raphé. En effet, les régions riches en corps cellulaires noradrénergiques et dopaminergiques, c'est à dire le locus coeruleus (LC) et l'aire tegmentale ventrale (ATV), expriment les récepteurs 5-HT_{2A/2C} (Guiard et al., 2009 ; Di Giovanni et al., 2010), ce qui laisse envisager une possible modulation indirecte de l'activité du système 5-HT et de la réponse aux ISRS via ces systèmes.

● Au niveau terminal, les ISRS augmentent les concentrations extracellulaires de sérotonine mais différentes études de microdialyse rapportent qu'en dépit de leur sélectivité, ils sont également capables d'augmenter les concentrations extracellulaires de noradrénaline ([NA]_{ext}) et/ou de dopamine ([DA]_{ext}) dans le cortex frontal chez rat et la souris (Jordan et al., 1994; Shachar et al., 1997; Millan et al., 2001; Koch et al., 2002; Beyer et al., 2002; Bymaster et al., 2002; David et al., 2003; Kobayashi et al., 2008). Différentes mécanismes pourraient expliquer de telles observations et notamment le fait que les ISRS, malgré leur sélectivité *vis à vis* du SERT, agissent en se fixant et en bloquant le transporteur de la noradrénaline (Owens et al., 2000). Ainsi, à la lumière de ces différents résultats, différentes questions peuvent être soulevées :

1) l'activité des ISRS peut elle être soumise à un rétrocontrôle indépendant des autorécepteurs 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}?

2) la sélectivité des ISRS déterminée *in vitro* reflète elle leurs propriétés pharmacologiques *in vivo* ?

3) Enfin, la mise en jeu des interactions entre les systèmes monoaminergiques centraux au niveau des corps cellulaires mais également des terminaisons sérotoninergiques, peuvent elles expliquer, du moins en partie, le fait que les ISRS augmentent les ([NA]_{ext}) ?

Dans la première partie de cette revue bibliographique, nous détaillerons brièvement, en raison de la littérature et des connaissances abondantes sur cet aspect, le fonctionnement du système sérotoninergique central (synthèse, libération) et le rôle de certains éléments clé du système sérotoninergique tels que les récepteurs **5-HT_{1A}**, **5-HT_{2A}** et **5-HT_{2C}**, ou le transporteur **SERT** dans la réponse aux ISRS.

Dans la deuxième partie, nous décrirons les connaissances actuelles sur les troubles de l'humeur et leurs traitements en insistant toutefois sur les principales propriétés pharmacologiques du **escitalopram** récemment commercialisé et principalement utilisé dans cette thèse.

Enfin, dans la troisième partie de ce document, nous synthétiserons les connaissances actuelles sur les interactions anatomiques et fonctionnelles entre les neurones sérotoninergiques et noradrénergiques dans le système nerveux central. Il est en effet possible qu'une meilleure connaissance de ces interactions puisse permettre de préciser le mécanisme d'action des ISRS chez l'Animal et peut être d'en améliorer l'efficacité thérapeutique.

Dans ce contexte, notre travail repose sur différentes études *in vivo* mettant en œuvre des techniques complémentaires de microdialyse intracérébrale chez la souris éveillée, libre de ses mouvements et de d'électrophysiologie afin d'évaluer l'intensité du blocage de la recapture des monoamines (5-HT, NA et DA) par les ISRS. Ces études ont eu pour but de préciser leur mécanisme d'action, notamment à partir de l'identification de différentes cibles grâce à des approches pharmacologiques [utilisation de différents ligands (agonistes/antagonistes) des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OHDPAT, WAY100635), 5-HT_{2A} (DOI, MDL100907) et 5-HT_{2C} (WAY 161503, SB 242084)] et génétiques [utilisation de souris

mutantes privées (Knockout, KO) des récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} ou des transporteurs de la 5-HT (KO SERT)].

Enfin, les différents travaux de cette thèse sont le fruit de différentes collaborations prestigieuses dont:

- le Département de Neurosciences et de Psychiatrie de l'Université de Columbia (New-York, USA) dirigée par le Dr René Hen,

- le Dr Sophie Gautron de l'unité INSERM U952, de l'Université Paris 06 (Paris, France).

- le Dr Connie Sanchez des Laboratoires Lundbeck (Paramus, New-Jersey, USA).

RAPPELS BIOGRAPHIQUES

A. LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE ET LES ELEMENTS CLES DE LA REPONSE AUX ISRS

1. La sérotonine : synthèse, libération, inactivation, localisation et rôle physiologique

La sérotonine (5-hydroxy-tryptamine, 5-HT) est une indolamine synthétisée au niveau périphérique par les cellules entérochromaffines, mais aussi au niveau central puisqu'elle ne franchit pas la barrière hémato-encéphalique.

La biosynthèse de la 5-HT s'effectue par des enzymes à partir d'un acide aminé précurseur, le L-tryptophane, présent dans l'alimentation et véhiculé du sang vers le système nerveux central (SNC) par un transporteur commun à d'autres acides aminés neutres à longue chaîne (Fernstrom et Wurtman, 1972; Young et al., 1977; Kuhn et al., 1986).

L'étape limitante de la synthèse de sérotonine est catalysée par la tryptophane hydroxylase (TPH) (**Figure 2**). Il existe deux isoformes de cette enzyme. La TPH-2 est exprimée dans le SNC tandis que la TPH-1 est exprimée à la périphérie (Walther et al., 2003). En réalité, l'expression de ces deux enzymes ne serait pas aussi compartimentée car des travaux récents suggèrent que la TPH-1 serait présente également dans le SNC (Gundlach et al., 2005). La réaction catalysée par cette enzyme est une réaction d'hydroxylation du L-Tryptophane. Le produit de cette réaction est le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) qui est ensuite décarboxylé par la décarboxylase des acides aminés aromatiques pour donner la sérotonine. Une fois synthétisée, la sérotonine est encapsulée dans des vésicules au moyen d'un transporteur spécifique appelé VMAT-2. La libération fait intervenir deux modes physiologiques opposés, l'un calcium (Ca^{2+})-dépendant (exocytose) et l'autre Ca^{2+} -indépendant. Le premier mode entraîne une libération « quantique » de 5-HT selon un processus d'exocytose et sensible à la tétrodotoxine (TTX) (Sharp et al., 1990). Le second est à l'origine d'un processus de libération, Ca^{2+} -indépendant et insensible à la TTX (Rudnick et Wall, 1992a,b). Ce dernier mobilise le transporteur selon un mode « inverse », transportant la 5-HT du milieu intraneuronal vers le milieu extraneuronal. La quantité extracellulaire de sérotonine est modulée par le transporteur SERT sélectif de la sérotonine. La dégradation de la 5-HT est assurée par la Monoamine Oxydase de type B, enzyme intra-mitochondriale présente dans les neurones sérotoninergiques (Shih, 2004) pour former du 5-HIAA, qui est ensuite excrété dans le LCR puis dans les urines.

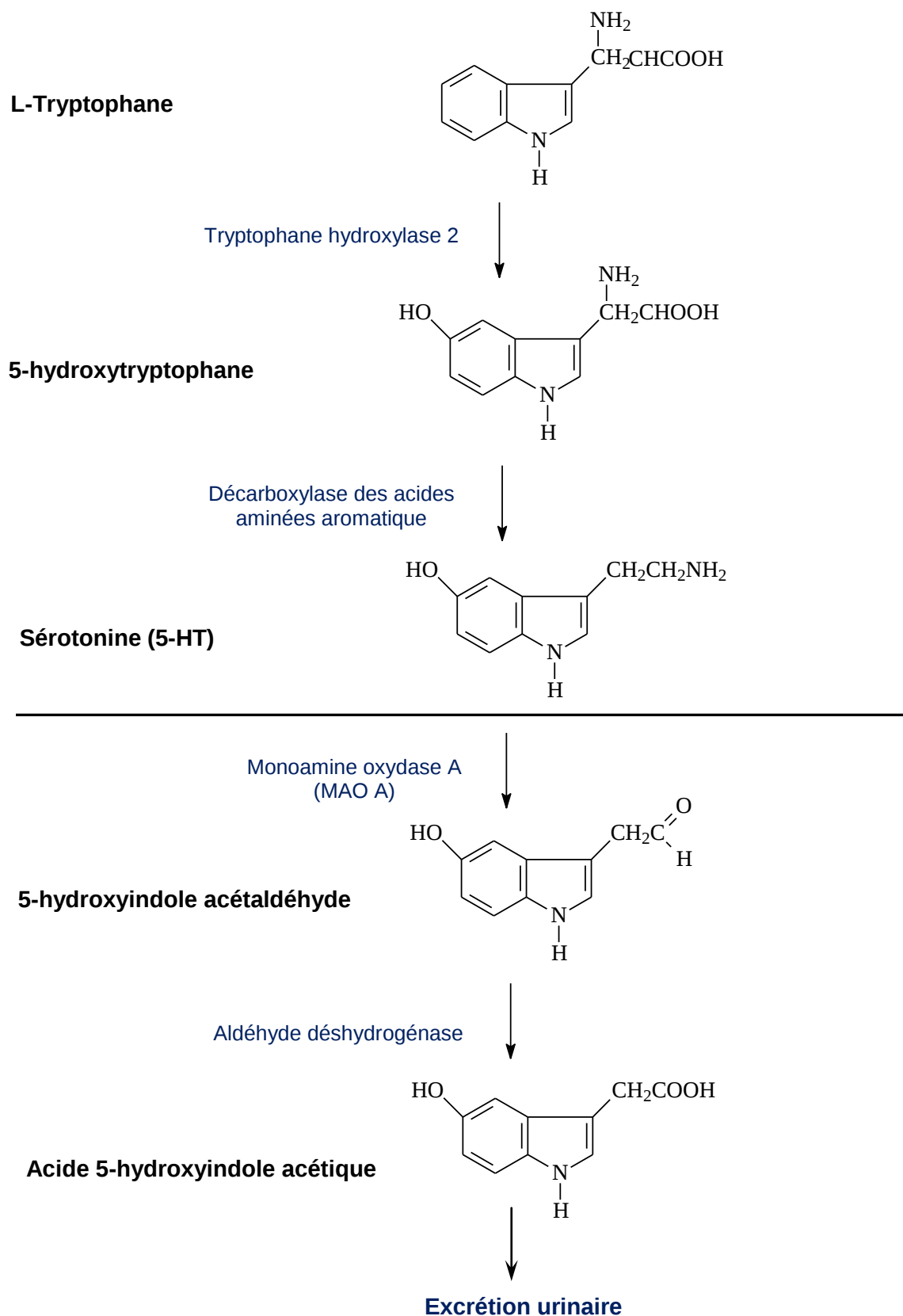


Figure 2: Voies de biosynthèse et d'inactivation de la sérotonine

L'étape limitante dans la voie de biosynthèse de la sérotonine est catalysée par une enzyme, la tryptophane hydroxylase. Dans le système nerveux central, cette enzyme est exclusivement localisée dans les neurones sérotoninergiques (D'après Hamon, 1995).

2. Les récepteurs de la sérotonine : classification et rôles

La classification actuelle des récepteurs sérotoninergiques est hétérogène. Hormis le récepteur 5-HT₃ qui appartient à la superfamille des récepteurs ionotropiques, tous les autres récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs métabotropiques formés de 7 domaines transmembranaires et couplés aux protéines G. Cette nomenclature classe les seize sous-types de récepteurs sérotoninergiques en sept familles : 5-HT₁ (1A, 1B/1D, 1E, 1F); 5-HT₂ (2A, 2B, 2C) (**Tableau 1**) ; 5-HT₃ (3A, 3B, 3C), 5-HT₄, 5-HT₅ (5A, 5B), 5-HT₆ et 5-HT₇ (**Tableau 2**). Pour certains d'entre eux, comme les récepteurs 5-ht_{1E}, 5-ht_{1F}, 5-ht_{5B}, leur rôle physiologique reste encore à préciser. La nomenclature internationale nomme actuellement ces récepteurs avec une lettre « minuscule » : « 5-ht ». Notons enfin que les sous-types 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B/D} sont situés non seulement sur les neurones post-synaptiques mais également sur la membrane des corps cellulaires ou des terminaisons neuronales des neurones sérotoninergiques présynaptiques, où ils jouent un rôle majeur de rétrocontrôle inhibiteur sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques, la synthèse et la libération de 5-HT.

Nous limiterons notre revue bibliographique aux récepteurs de la 5-HT dont j'ai plus particulièrement étudié le rôle lors de ce travail de thèse. La description des sous-types d'autorécepteurs 5-HT_{1A} et des sous-types d'hétérorécepteurs 5-HT_{2A/2C}, dont différentes études soulignent des modulations fonctionnelles entre eux, fera donc l'objet d'une partie significative de cette revue bibliographique (Roth et al., 1998 ; Hoyer et al., 2002 ; Ovestreet et al., 2003 ; Van oekelen et al., 2003 ; Celada et al., 2004 ; Drevets et al., 2007 ; Rosenzweig-Lipson et al., 2007 ; Berg et al., 2008 ; Savitz et al., 2009 ; Ohno, 2010).

Récepteurs	Gène	Couplage	Marqueurs radioactifs	Implications	Agonistes	Antagonistes
5-HT _{1A}	HTR1A	G _{i/o} – ↓ AMPc	[³ H]WAY 100635 [³ H]-8-OH- DPAT	Anxiété, Dépression, comportement sexuel, Comportement alimentaire, Régulation thermique	8-OH-DPAT (sélectif); 5-CT; Aripiprazole; Buspirone; (anxiolytic and antidepressant); Cannabidiol; Clozapine; Dihydroergotamine; Eltoprazine; Ergotamine; Flesinoxan; Flibanserin; Gepirone; Ipsapirone	Alprenolol; Asenapine ; BMY 7378 ; Cyanopindolol; Iodocyanopindolol; Lecozotan; Methiothepin; NAN-190; Nebivolol; Oxprenolol; (±) Pindolol; Propanolol; Robalzotan; S15535; Spiperone; TFMPP; UH-301; WAY- 100135; WAY-100635 (sélectifs).
5-HT _{1B}	HTR1B	G _{i/o} – ↓ AMPc	[¹²⁵ I]GTI; [¹²⁵ I]CYP (rat); [³ H]- sumatriptan; [³ H]-GR 125743;	Locomotion, Analgésie, Anxiété, Dépression, Agressivité	5-CT; CP-93,129; CP- 94,253; Dihydroergotamine; Eltoprazine; Ergotamine Methysergide; RU 24969 TFMPP; Triptans ; antimigraine; Zolmitriptan Eletriptan; Sumatriptan	Alprenolol; AR-A000002; Asenapine; Cyanopindolol; GR 127935; Iodocyanopindolol; Isamoltane; Metergoline; Methiothepin; Oxprenolol; Pindolol; Propanolol; SB 224289 ; SB 216641; GR 55562 ; Yohimbine
5-HT _{1D}	HTR1B	G _{i/o} – ↓ AMPc	[¹²⁵ I]GTI; [³ H]- sumatriptan; [³ H]-GR 125743;	Locomotion, Anxiété, Dépression,	5-CT; Dihydroergotamine ; Ergotamine; Methysergide Triptans; antimigraine; Almotriptan; Eletriptan; Frovatriptan; Naratriptan; Rizatriptan; Sumatriptan.	BRL-15572; GR 127935 (sélectifs); Ketanserin; Metergoline; Methiothepin; Rauwolscine; Ritanserin
5-HT _{1E}	HTR1E	G _{i/o} – ↓ AMPc	[³ H]-5-HT	Migraine	Eletriptan; Methysergide; Tryptamine	Methiothepin
5-HT _{1F}	HTR1F	G _{i/o} – ↓ AMPc	[¹²⁵ I]LSD; [³ H]LY 334370;	Migraine	LY334370 ; COL-144	
5-HT _{2A}	HTR2A	G _{q/11} – IP3/DAG	[³ H]DOI; [³ H]kétansérine ; [³ H]MDL 100907	Régulation thermique, Schizophrénie, Anxiété	2C-B; 5-MeO-DMT; BZP Bufotenin; DMT; DOM; DOI (sélectif); mCPP (meta – Chlorophenyl piperazine); Ergonovine; Lisuride; LSD; Mescaline; Myristicin; Psilocin; Psilocybin; TFMPP (partial agonist or antagonist); Yohimbine	Atypical antipsychotics; Aripiprazole; Asenapine; Amisulpride; Clomipramine; Cyproheptadine; Eplivanserin; Etoperidone; Iloperidone; Kétansérine; SR 46349B; MDL 100907 (sélectifs) antihypertensive; Methysergide; Mianserin; Mirtazapine.
5-HT _{2B}	HTR2B	G _{q/11} – IP3/DAG	[³ H]-5-HT	Anxiété ; Migraine ; Comportement alimentaire	BW-723C86 (sélectif); Fenfluramine ; MDMA ; Norfenfluramine ; Ro60- 0175	Agomelatine; Asenapine; BZP; Ketanserin; Methysergide; Ritanserin; Tegaserod; Yohimbine; SB 200646; SB 204741 (sélectifs)
5-HT _{2C}	HTR2C	G _{q/11} – IP3/DAG	[³ H]- Mésulergine	Anxiété ; Migraine ; Comportement alimentaire	AL-38022A; Aripiprazole; Ergonovine; Lorcaserin; Ro60-0175; WAY 161503 (sélectifs); mCPP (meta - Chlorophenylpiperazine); TFMPP; Trazodone ; hypnotic; YM-348	SB 206553; RS 102221; Mésulergine; SB 242084 (sélectifs); Agomelatine; Asenapine; Clomipramine; Clozapine ; antipsychotic; Fluoxetine; Iloperidone; Ketanserin ; Lisuride; Mianserin; Mirtazapine; Nefazodone; Olanzapine; Risperidone; Ritanserin; Ziprasidone

Tableau 1: Classification des récepteurs 5-HT₁ et 5-HT₂ (D'après Hoyer et al., 2002).

En gras sont indiquées les molécules qui ont été étudiées dans ce travail de thèse.

Récepteurs	Gène	Couplage	Marqueurs radioactifs	Implications	Agonistes	Antagonistes
5-HT ₃	<i>HTR3A</i> <i>HTR3B</i> <i>HTR3C</i> <i>HTR3D</i> <i>HTR3E</i>	Canal cationique	[³ H]granisetron [³ H]tropisetron [³ H]GR 65630	Anxiété, Locomotion, Schizophrénie	2-Methyl-5-HT ; BZP; Quipazine; RS-56812; (sélectif)	SR 57227; m-chlorophenyl- biguanide (sélectif); Alosetron; Several antiemetics; Dolasetron ; Ondansetron; Granisetron ; Tropisetron ; Clozapine ; Memantine ; Metoclopramide ; Mianserin ; Mirtazapine; Olanzapine ; Quetiapine
5-HT ₄	<i>HTR4</i>	G _s – ↑ AMPc	[³ H]GR 113808 [³ H]RS 57639	Anxiété, Cognition, Alzheimer	5-MT; BIMU-8; Cisapride;gastroprokinetic Dazopride;Metoclopramid ;Mosapride; Prucalopride;	L-Lysine; Piboserod
5-HT _{5A}	<i>HTR5A</i>	G _{i/o} – ↓ AMPc	[¹²⁵ I]LSD; [³ H]-5-CT	Locomotion, sommeil	5-CT; Ergotamine; Valerenic Acid	Asenapine; Dimebolin; Methiothepin; Ritanserin; SB 699551; SB 699551-A
5-HT _{5B}	<i>HTR5B</i>		[¹²⁵ I]LSD; [³ H]-5-CT	Non identifié		
5-HT ₆	<i>HTR6</i>	G _s – ↑ AMPc	[¹²⁵ I]SB 258585; [¹²⁵ I]LSD; [³ H]-5-HT	Anxiété, Cognition, mémoire	EMD 386088; EMDT	Asenapine; Clomipramine; Clozapine ; Dimebolin; EGIS 12233; Iloperidone; MS 245; Olanzapine; Ro 046790; SB 258585; SB 271046; SB 357134; SB 399885 (sélectifs)
5-HT ₇	<i>HTR7</i>	G _s – ↑ AMPc	[¹²⁵ I]SB 269970; [¹²⁵ I]LSD; [³ H]-5-HT; [³ H]-5-CT	Anxiété, sommeil, mémoire, respiration	5-CT; AS-19; SB 258719 (sélectif)	SB 269970 (sélectif); Amitriptyline; Aripiprazole; Asenapine; Clomipramine; Clozapine; EGIS-12233; Iloperidone; Imipramine; Ketanerlin; Mirtazapine; Olanzapine; Ritanserin.

Tableau 2: Classification des récepteurs 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇ (D'après Hoyer et al., 2002)

2.1. Les auto- et hétéro-récepteurs 5-HT_{1A}

Le récepteur 5-HT_{1A} a été le premier récepteur sérotoninergique entièrement séquencé (Kobilka et al., 1987). Les gènes codant pour le récepteur 5-HT_{1A} humain et celui de Rat, ont été isolés par criblage de banques génomiques humaines avec des séquences d'ADN homologues aux adrénorécepteurs puis identifiés chez l'Homme et le Rat (Fargin et al., 1988; Albert et al., 1990). Le récepteur 5-HT_{1A} humain présente 89% d'homologie avec celui du Rat.

1) Distribution

La distribution du récepteur 5-HT_{1A} dans le cerveau de Rat a été étudiée par autoradiographie en utilisant des ligands marqués comme la [³H]-5-HT, le [³H]-8-OHDPAT, l'[*³H]-ipsapirone et plus récemment le [³H]-WAY100635 (Pazos et al., 1985; Hoyer et al.,

1986; Khawaja, 1995). Ce dernier ligand a aussi été utilisé pour la localisation des récepteurs 5-HT_{1A} centraux chez la Souris (Laporte et al., 1994). Plus récemment, des études d'imageries cérébrales par tomographie à émission de positrons (PET), utilisant l'injection [¹¹C]-WAY100635 ou [¹⁸F]MPPF (4-[¹⁸F]fluoro-N-[2-[1-(2-methoxyphenyl)-1 piperazinyl]ethyl-N-2-pyridinyl-benzamide), ont permis de localiser le récepteur 5-HT_{1A} dans le cerveau humain (Lundberg et al., 2007 ; Aznavour et Zimmer, 2007 ; Sibon et al., 2008). Les études de liaison montrent que le récepteur 5-HT_{1A} est largement distribué dans le SNC. Il est présent sous forme d'autorécepteur somatodendritique, sur les neurones sérotoninergiques dans les noyaux du raphé du mésencéphale (noyaux du raphé B8 médian et du raphé B7 dorsal). Le récepteur 5-HT_{1A} est aussi présent en tant que récepteur postsynaptique dans les structures limbiques et notamment l'hippocampe, le septum latéral et différentes aires corticales (Fink et Gothert, 2007; Filip et Bader, 2009). La distribution des ARNm codant pour le récepteur 5-HT_{1A} selon la technique d'hybridation in situ, est en tous points superposable à celle obtenue par des techniques de liaison des différents ligands radioactifs cités ci-dessus (Chalmers et Watson, 1991; Miquel et al., 1991; Pompeiano et al., 1992; Burnet et al., 1995a,b). La distribution du récepteur 5-HT_{1A} est en règle générale similaire selon les espèces étudiées même si des différences d'organisation entre les Rongeurs et l'Homme apparaissent dans les différentes couches corticales et hippocampiques (El Mestikawy et al., 1990). Il est intéressant de noter que l'utilisation d'anticorps dirigés contre la troisième boucle intracellulaire du récepteur 5-HT_{1A} de Rat a permis de confirmer la localisation du récepteur 5-HT_{1A} obtenue par les deux autres techniques (El Mestikawy et al., 1990; Miquel et al., 1991).

2) Couplage et propriétés électrophysiologies des récepteurs 5-HT_{1A}

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont couplés, selon le tissu étudié, à différents systèmes effecteurs: un effecteur enzymatique produisant une inhibition de l'adénylate cyclase (AC) et deux effecteurs ioniques, l'un activateur d'un canal potassique et l'autre inhibiteur d'un canal calcique (Haj-Dahmane et al., 1991; Oleskevich, 1995; Chen et Penington, 1996) (**Figure 3**). La stimulation de ces récepteurs provoque une baisse de l'activité de l'adénylate cyclase stimulée par la forskoline dans l'hippocampe de rat et de cobaye (Bockaert et al., 1987; Adrien et al., 1989; Schoeffter et Hoyer, 1989; Varrault et al., 1992; Zgombick et al., 1993). Concernant les effecteurs ioniques, le couplage du récepteur à une protéine G_i/G_o activant un canal potassique a été mis en évidence dans l'hippocampe et le raphé (Oleskevich, 1995;

Katayama et al., 1997) tandis que l'inhibition du canal calcique a uniquement été mise en évidence dans le raphé chez le Rat (Chen et Penington, 1996). Les deux types d'effecteurs sont couplés au récepteur via une protéine G_i/G_o puisque l'activation du récepteur est bloquée par la toxine pertussique. De nombreuses études utilisant divers systèmes d'expression (*Escherichia Coli*, cellules de mammifères) montrent que lorsque le récepteur $5-HT_{1A}$ est stimulé par la 5-HT ou le 8-OH-DPAT, il fixe les protéines G_i dans l'ordre suivant $G_{i\alpha3} > G_{i\alpha2} > G_{i\alpha1} > G_{o\alpha} > G_{z\alpha}$ (Raymond et al., 1993; Raymond et al., 2001). Le récepteur $5-HT_{1A}$ présynaptique présente des caractéristiques de couplage et de réponses fonctionnelles différentes de celles de son homologue postsynaptique (Clarke et al., 1996) bien qu'un seul gène codant pour ce récepteur ait été identifié à ce jour.

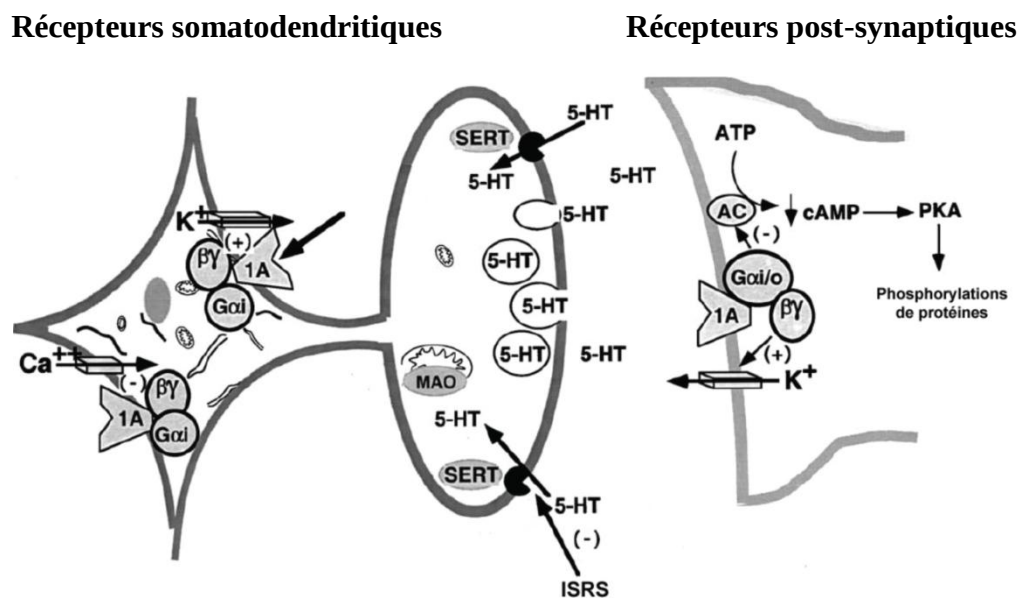


Figure 3 : Récepteur $5-HT_{1A}$ et voies de signalisation (D'après Hensler, 2003).

3) Expression des récepteurs $5-HT_{1A}$ chez les patients dépressifs

De manière intéressante, il a été proposé que le niveau d'expression des récepteurs $5-HT_{1A}$ puisse être modulé chez les patients dépressifs en comparaison à des sujets sains. Le **tableau 3** indique le niveau d'expression des récepteurs $5-HT_{1A}$ dans différentes structures cérébrales chez les sujets dépressifs. Utilisant différentes méthodes (liaison, PET, ARNm), la

plupart de ces études sont en faveur d'une baisse ou d'une absence de modification de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}. Seule une étude rapporte une augmentation. Ainsi, une tendance à une diminution de l'expression des récepteurs 5-HT_{1A} apparaît comme un bon indicateur d'un état dépressif.

Région cérébrale	Méthode	Variation	Références
Raphé	Liaison	Augmentation	Stockmeier et al., 1998
Raphé	Liaison	Diminution	Arango et al., 2001
Raphé	PET	Diminution	Drevets et al., 2000 ; Meltzer et al., 2004
Hippocampe	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Cortex frontal	PET	Diminution	Bhagwagar et al., 2004 ; Sargent et al., 2000 ; Drevets et al., 2000.
Cortex frontal	ARNm	Diminution	Lopez-Figueroa et al., 2004 ;
Raphé	PET	Inchangé	Bhagwagar et al., 2004
Hippocampe	Liaison	Inchangé	Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	Liaison	Inchangé	Arranz et al., 1994; Lowther et al., 1997; Stockmeier et al., 1997
Cortex frontal	PET	Inchangé	Meltzer et al., 2004

Tableau 3 : Expression des récepteurs 5-HT_{1A} chez des patients dépressifs

Ce tableau souligne la variabilité des résultats, probablement en raison des variations de l'intensité de l'état dépressif des patients, de la nature de leur traitement antidépresseur, des approches méthodologies et/ou, des régions cérébrales étudiées. Par exemple, des études *post mortem* menées chez des patients suicidés soulignent une importante augmentation de la densité des autorécepteurs 5-HT_{1A}, dans le noyau du raphé dorsal (NRD) (Stockmeier et al., 1998; Boldrini et al., 2008). D'autres études de tomographie par émission de positrons (PET) chez des patients dépressifs vivants, ont révélé une diminution de la capacité de liaison de ces récepteurs (Meltzer et al., 2004; Drevets et al., 2007 ; Takano et al., 2011). Cependant, chez ces patients, de nombreux éléments peuvent expliquer cette diminution de l'expression du récepteur, notamment la diminution du nombre de neurones sérotoninergiques, un traitement

antidépresseur ou une élévation chronique de cortisol plasmatique. En outre chez les individus dépressifs suicidés, une diminution du nombre de neurones sérotoninergiques exprimant le transporteur de la sérotonine dans le noyau du raphé dorsal (Arango et al., 2001) est accompagnée d'une diminution du nombre de projections sérotoninergiques vers le cortex (Austin et al., 2002). Du côté post-synaptique, une diminution de l'expression d'ARNm de ce récepteur a été observée dans l'hippocampe des patients (Lopez-Figueroa et al., 2004). La diminution des récepteurs 5-HT_{1A} a également été révélée dans le cortex préfrontal par PET chez des patients souffrant d'épisodes dépressifs (Sargent et al., 2000; Drevets et al., 2000; Drevets et al., 2007; Hasler et al., 2007; Moses-Kolko et al., 2008).

4) Régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}

Le gène codant pour le récepteur 5-HT_{1A} est sous le contrôle de différents modulateurs tels que Deaf1, Freud-1, Freud-2, REST, et HES (**Figure 4**). Parmi ces modulateurs, Deaf 1 semble jouer un rôle prépondérant dans la régulation de l'expression pré- et post-synaptique du récepteur 5-HT_{1A} notamment en raison d'un polymorphisme chez l'homme qui modifie sa capacité à se fixer sur la région promotrice du gène.

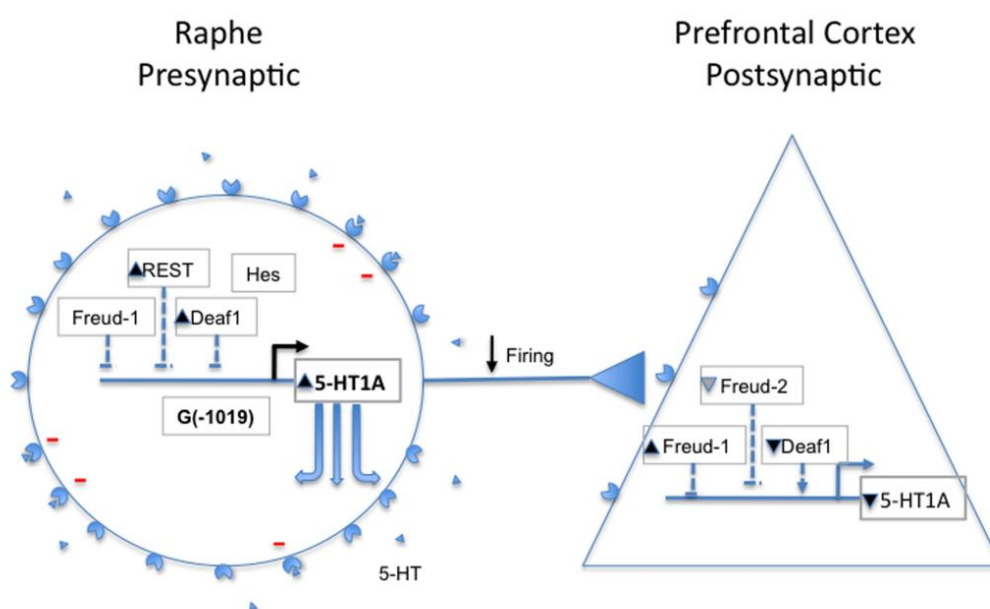


Figure 4 : Régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}
(D'après Albert et François, 2010)

- Au niveau pré-synaptique, Deaf-1 joue un rôle de « répresseur ». En effet, lorsqu'il se lie sur une cytosine située en position « 1019 », il diminue l'expression de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. Au contraire, la présence d'une guanine empêche la fixation de Deaf-1, ce qui favorise cette expression.

- Au niveau post-synaptique, Deaf-1 joue un rôle complètement différent puisqu'il est supposé exercer une activité similaire à celle d'un « enhancer » de telle sorte que la présence de la cytosine augmente l'expression de l'hétérorécepteur tandis que celle de la guanine réduit cette expression (Albert et al., 1996; Albert et Lemonde, 2004 ; Albert et Lemonde, 2010).

Ainsi l'allèle C est favorable à une répression de l'autorécepteur 5-HT_{1A} et à une stimulation de l'expression de l'hétérorécepteur 5-HT_{1A} post-synaptique. Au contraire, L'allèle G serait responsable d'une augmentation des taux d'autorécepteurs, réduisant l'activité des neurones sérotoninergiques, et diminuant l'expression des récepteurs postsynaptiques.

D'autres facteurs de transcriptions mentionnés ci-dessus interviennent également dans la régulation de l'expression du récepteur 5-HT_{1A}. Les protéines Hes sont elles présentent uniquement dans les précurseurs neuronaux et les neurones immatures. Chez les souris KO Hes1, l'expression de l'ARN du récepteur 5-HT_{1A} est augmentée dans le cerveau des embryons (Jacobsen et al., 2008) suggérant que l'allèle G(-1019) peut entraîner une altération des taux de récepteurs 5-HT_{1A} pendant la période embryonnaire.

En accord avec ces données, les études génétiques montrent que le génotype CC est majoritairement associé à une meilleure réponse aux ISRS même si environ 50% des recherches n'ont identifié aucune corrélation (**Tableau 4**)

Polymorphisme	Génotype	Ethnie	ISRS	Corrélation	Référence
1019C/G	CC vs GG	Caucasien	ISRS	○	Noro et al., 2010
	CC vs GG	Asiatique	ISRS	○	Lin et al., 2009
	CC vs GG	Caucasien	ISRS	○	Levin et al., 2007
	CC vs GG	Caucasien	Citalopram	○	Arias et al., 2005
	CC vs GG	Caucasien	Fluvoxamine	○	Serretti et al., 2004
1019C/G	CC	Caucasien	Paroxétine	↗	Yevtushenko et al., 2010
	CC	Asiatique	Fluoxétine	↗	Yu et al., 2006
	CC	Caucasien	ISRS	↗	Parsey et al., 2006
	CC	Asiatique	Fluoxétine	↗	Hong et al., 2006
	CC	Caucasien	Fluoxétine	↗	Lemondet et al., 2004
1019C/G	GG	Asiatique	ISRS	↗	Kato et al., 2009
	GG	Caucasien	ISRS	↗	Baune et al., 2008

Tableau 4 : Relation entre le polymorphisme 1019C/G du gène codant pour le récepteur 5-HT_{1A} et la réponse aux ISRS.

5) Dichotomie de réponse au ISRS des récepteurs 5-HT_{1A} pré- et post-synaptiques

Des différences de régulation entre les récepteurs 5-HT_{1A} pré- (i.e. les autorécepteurs) et post-synaptiques ont été observées. Ainsi, dans certaines conditions pharmacologiques, les capacités d'adaptations fonctionnelles des autorécepteurs somatodendritiques du NRD et des hétérorécepteurs postsynaptiques dans les structures limbiques (hippocampe en particulier) présentent des différences notables. Par exemple, l'administration chronique d'ISRS (de Montigny et al., 1981; Le Poul et al., 2000) ou d'agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (Blier et de Montigny, 1987; Schechter et al., 1990; Jolas et al., 1993) induit une désensibilisation fonctionnelle des autorécepteurs 5-HT_{1A} dans le NRD sans affecter la fonctionnalité des récepteurs post-synaptiques dans l'hippocampe. A l'inverse, il a été montré, grâce aux techniques d'électrophysiologie, qu'après 2 à 3 semaines de traitement avec un antidépresseur tricyclique, ou des électrochocs, la sensibilité des récepteurs 5-HT_{1A} postsynaptiques de l'hippocampe pouvait être augmentée (de Montigny et Aghajanian, 1978; Gravel et de

Montigny, 1987 ; Haddjeri et al., 1998 ; Shen et Meller, 2002 ; Castro et al., 2003). Ces différences fonctionnelles ont été corrélées à des différences dans le couplage des récepteurs 5-HT_{1A} aux protéines G: des protéines de type G_O seraient couplées aux récepteurs 5-HT_{1A} dans l'hippocampe, alors qu'il s'agirait de protéines de type G_{i3} dans le NRD (Mannoury la Cour et al., 2001).

6) Les récepteurs 5-HT_{1A} et les troubles anxio/dépressifs

Etant donné le rôle central exercé par le récepteur 5-HT_{1A} dans la régulation du système sérotoninergique, de nombreuses études se sont intéressées à son rôle dans l'étiologie des troubles anxieux et dépressifs. L'utilisation de souris mutées, n'exprimant pas le récepteur 5-HT_{1A}, dites «knockout» constitutives, obtenues par recombinaison homologe (KO 5-HT_{1A}) issues de trois fonds génétiques différents, [fond 129/Sv (Ramboz et al., 1998), C57Bl/6J (Heisler et al., 1998) et Swiss Webster (Parks et al., 1998)], a permis de confirmer que le récepteur 5-HT_{1A} pouvait moduler les comportements de type anxieux. C'est le cas par exemple de l'hétérorécepteur postsynaptique 5-HT_{1A} dont l'activation, au cours du développement, permet d'exercer des effets de type anxiolytiques chez la Souris (Gross et al., 2002). En revanche, les animaux surexprimant ce récepteur pendant la période postnatale, affichent des comportements anxieux réduits (Kusserow et al., 2004). Il semble que l'expression du récepteur 5-HT_{1A} dans l'hippocampe et le cortex soit essentielle pour établir un phénotype comportemental « normal » (Gross et al., 2002; Alexandre et al., 2006; Deng et al., 2007; Mehta et al., 2007). En accord avec cette hypothèse, l'activation des récepteurs 5-HT_{1A} post-synaptiques produit des effets de type anxiolytique chez le Rongeur (Koek et al., 1998 ; De Vry et al., 2004). Plus récemment, Richardson-Jones et collaborateurs ont développé des souris qui expriment des taux variable de récepteurs 5-HT_{1A} (souris 5-HT_{1A}-High vs 5-HT_{1A}-Low) spécifiquement dans les noyaux du raphé. Les résultats suggèrent qu'un taux élevé d'autorécepteurs 5-HT_{1A} induit une vulnérabilité au stress (Richardson-Jones et al., 2010) mettant ainsi en évidence un facteur de risque potentiel pour un allèle du récepteur 5-HT_{1A} dans le développement d'un épisode dépressif chez l'Homme.

D'un point de vue mécanistique, l'analyse de l'activité électrique basale des neurones sérotoninergiques révèlent des résultats contradictoires avec soit une absence d'effet (Ramboz et al., 1998), soit une augmentation significative (x2) de la fréquence de décharge basale chez les souris mutantes (Richer et al., 2002). Ces résultats n'ont pas permis de déterminer

clairement si le récepteur 5-HT_{1A} exerce ou pas un contrôle tonique sur l'activité électrique basale des neurones 5-HT du raphé. Les études de microdialyse intracérébrale *in vivo* réalisées chez les souris KO 5-HT_{1A} issues du fond 129/SV ou Swiss Webster sont venues apporter des éléments complémentaires (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001). En effet, aucune différence de concentrations extracellulaires basales de 5-HT n'a été retrouvée entre les souris contrôles dites « Wild-Type » (WT) et les souris mutées dans différentes régions sérotoninergiques terminales telles que le striatum (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001) l'hippocampe (Knobelmann et al., 2001) ou le CFX (Guilloux et al., 2006) mais également au niveau du raphé dorsal (Bortolozzi et al ; 2004). Cependant, Parsons et collaborateurs (2001) ont montré dans l'hippocampe et le cortex frontal chez ces souris KO 5-HT_{1A} (fond génétique C57Bl/6J), une augmentation tonique des concentrations extracellulaires basales de 5-HT par rapport à leurs congénères WT non mutées. Différentes raisons pourraient expliquer ces résultats parfois contradictoires. Il est possible que l'inactivation génétique constitutive des récepteurs 5-HT_{1A} (autorécepteurs et hétérorécepteurs) masque le contrôle tonique des autorécepteurs sur les concentrations extracellulaires de 5-HT. En effet, différentes études montrent que les hétérorécepteurs 5-HT_{1A} régulent la libération du 5-HT via des longues boucles de rétrocontrôles négatifs partant du CFX (Casanovas et al., 1997 ; Hajos et al., 1999), de l'amygdale (Bosker et al., 1997) ou encore du locus coeruleus (Haddjeri et al., 2004). Il est aussi possible que la différence de fond génétique entre ces souris KO 5-HT_{1A} participe à cette contradiction.

Afin de différencier les effets des autorécepteurs de ceux des hétérorécepteurs 5-HT_{1A}, il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux présentant une inactivation sélective de l'un ou de l'autre de ces récepteurs. Pour cela l'équipe du Dr René Hen à l'Université de Columbia (New-York, USA) à mis au point un nouveau modèle de souris mutantes que nous avons caractérisé d'un point de vue neurochimique (cf. travaux présentés dans cette thèse : résultats **ARTICLE 2**).

2.2. Les hétéro-récepteurs 5-HT_{2A}

1) Distribution

La distribution du récepteur 5-HT_{2A} au sein du SNC a été largement décrite grâce à l'apport des techniques d'autoradiographie, d'hybridation *in situ*, d'immunohistochimie et de tomographie par émission de positons (PET) utilisant notamment comme marqueur le [¹¹C]MDL 100907 (Lundkvist et al., 1996 ; Ito et al., 1998). Ce récepteur est exprimé chez l'Homme dans la plupart des régions riches en terminaisons serotoninergiques, incluant le cortex et les bulbes olfactifs. Chez le rat, ce récepteur présent en concentration modérée, a été décrit dans le striatum et le noyau accumbens tels que le montre les études de liaisons avec différents ligands tels que la [³H]kétansérine (Pazos et al., 1985), le [³H]RP 62203 ou le [³H]MDL 100907 (Malgouris et al., 1993 ; Lopez-Gimenez et al., 1997). Par ailleurs, les techniques d'immunohistochimie ont montré que le récepteur 5-HT_{2A} serait essentiellement porté par les neurones GABAergiques situés dans les régions dopaminergiques (substance noire, aire tegmentale ventral, striatum et noyau accumbens), noradrénégiques (locus coeruleus) et peut-être par sur interneurones cholinergiques du striatum (Morilak et al., 1993 ; Burnet et al., 1995a,b ; Rodriguez et al., 2000). Le cortex frontal constitue de son côté l'une des régions les plus riches en sites et en ARNm 5-HT_{2A} chez le rat (Pazos et al., 1985; Pompeiano et al., 1994). La lésion des neurones 5-HT par la 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) ne modifiant pas la densité des sites de liaison pour la [³H]kétansérine, suggère que ces récepteurs ne sont pas présents sur cette population neuronale (Fischette et al., 1987). Chez le rat et la souris, environ 60% des neurones du cortex préfrontal expriment l'ARNm des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}, témoignant de la forte co-localisation de ces deux récepteurs (Amargós-Bosch et al., 2004).

2) Couplage des récepteurs 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} appartient à la super-famille des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés aux protéines G (RCPG). Il possède comme effecteur la phospholipase C (PLC) dont l'activité est dépendante d'une protéine G_q. L'activation de cette voie de signalisation conduit à une production d'IP₃ et de di-acylglycérol dont le rôle est d'activer la protéine kinase C (Landolt et al., 2009) (**Figure 5**). L'augmentation d'IP₃ cytoplasmique

provoque une libération de calcium intracellulaire à partir des stocks contenus dans le réticulum endoplasmique. D'autres cascades de transduction ont également été décrites pour le récepteur 5-HT_{2A} qui seraient ligand-dépendante (Raote et al., 2007).

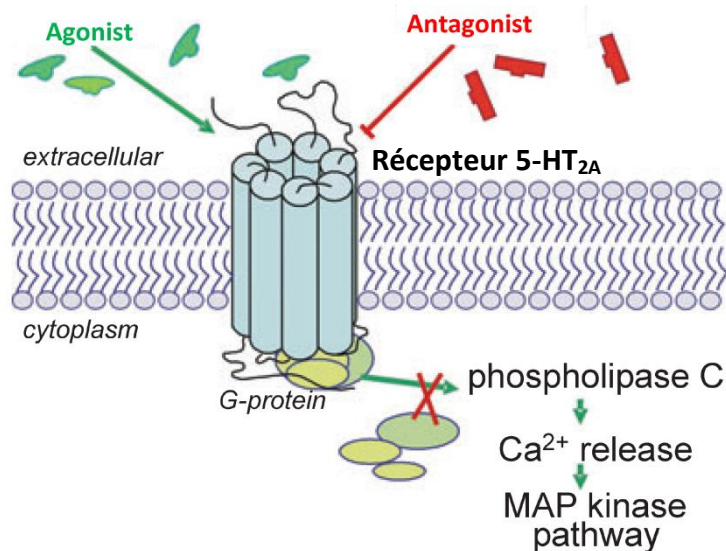


Figure 5 : Schéma représentant un récepteur 5-HT_{2A}.

Chaque récepteur 5-HT_{2A} est constitué de sept domaines transmembranaires. La troisième boucle cytoplasmique semble participer au couplage avec la protéine G. Lors de l'activation du récepteur, la protéine G induit une cascade intracellulaire impliquant la phospholipase C, la libération de Ca²⁺ à partir de sites de stockage intracellulaires et la voie des MAP kinases (D'après Landolt et al., 2009).

3) Polymorphisme du récepteur 5-HT_{2A} (rôle dans la dépression et la réponse aux ISRS)

Les récepteurs 5-HT_{2A} sont codés par le gène HTR2A. Chez l'Homme, ce gène est situé sur le chromosome 13. Plusieurs polymorphismes ont été identifiés: -1438G/A (rs6311), T102C (rs6313) et His452Tyr (rs6314) et des études ont mis en évidence des liens entre ces polymorphismes et la sensibilité des patients aux troubles dépressifs (Chee et al., 2001 ; Choi et al., 2005) et/ou à la réponse aux ISRS (**tableau 5**).

Polymorphisme	Génotype	ISRS	Corrélation	Référence
Rs A/G	AA vs GG	ISRS	○	Bishop et al., 2006
	AA vs GG	Paroxétine	○	Tanaka et al., 2008
	AA vs GG	Fluvoxamine	○	Sato et al., 2002
	AG vs GG	Citalopram	↗	Choi et al., 2005
	AG vs GG	Flovoxamine	↗	Suzuki et al., 2006
	AG vs GG	Escitalopram	↗	Uher et al., 2011
Rs G/G	GG	Citalopram	↗	McMahon et al., 2006
	GG	Paroxétine	↗	Wilkie et al., 2009
Rs C/C	CC	Paroxétine	↗	Murphy et al., 2004
	CC	ISRS	↗	Cusin et al., 2002

Tableau 5 : Etudes pharmacogénétiques sur l'association entre le polymorphisme du récepteur 5-HT_{2A} et la réponse aux ISRS.

4) Les récepteurs 5-HT_{2A} et les troubles anxio/dépressifs

a) Etudes comportementales

Des études d'imagerie révèlent une diminution de la liaison de ligands 5-HT_{2A} dans l'hippocampe de patients souffrant de dépression majeure (Mintun al., 2004). Toutefois, il est difficile de savoir s'il existe une corrélation entre les polymorphismes des récepteurs 5-HT_{2A} et la survenue d'un épisode dépressif majeur (Minov al., 2001 ; Choi al., 2005). Récemment, des études utilisant une souris transgénique avec une inactivation complète du récepteur 5-HT_{2A} dans le cerveau ou spécifique dans le cortex, montrent un rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans la modulation de l'anxiété. En effet, des souris mutantes pour ce récepteur présentent des réponses similaires à celles obtenues lors de l'administration d'anxiolytiques notamment dans des tests comportementaux comme « l'open field » et « le novelty suppressed feeding » (Weisstaub et al., 2006). En accord avec ces résultats, des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} présentent un profil anxiolytique et/ou antidépresseur dans un certain nombre de paradigmes comportementaux (Stutzmann et al, 1991; Motta et al, 1992; Costall et Naylor, 1995 ; Patel et

al., 2004 ; Diaz et Maroteaux, 2011). En dépit de ces études, le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans les comportements de type antidépresseur demeure controversé (Sibille et al., 1997 ; Weisstaub et al., 2006 ; Halberstadt et al., 2009 ; 2011).

Concernant la réponse aux antidépresseurs, il est connu que l'administration chronique d'antidépresseurs appartenant à la classe des tricycliques (TCA), provoque une diminution de la densité corticale des récepteurs 5-HT_{2A} (Peroutka al., 1980). Toutefois, ces résultats restent controversés puisque des études menées chez les patients dépressifs montrent, au contraire, qu'un traitement prolongé avec un ISRS, augmente la densité des récepteurs 5-HT_{2A} dans le cortex frontal (Hrdina et al., 1993 ; Massou et al., 1997 ; Zanardi et Artigas, 1999). Ces résultats laisseraient donc entrevoir que la réponse antidépressive passe par l'augmentation de l'expression et probablement de l'activation de ces récepteurs.

b) Rétrocontrôle du système sérotoninergique par les hétérorécepteurs 5-HT_{2A} en conditions basales et en réponses aux ISRS

De données récentes suggèrent que l'activité électrique des neurones 5-HT est également contrôlée par des récepteurs 5-HT situés sur des neurones non sérotoninergiques (Serrats et al., 2005 ; Sharp et al., 2007) impliquant notamment les récepteurs 5-HT₂. La difficulté d'étudier cette sous-famille de récepteurs 5-HT₂ repose sur la faible sélectivité des ligands actuellement disponibles. Par exemple, même si la kétansérine et la spipérone sont environ deux fois plus affins pour le récepteur 5-HT_{2A} que pour les récepteurs 5-HT_{2B} et 5-HT_{2C}, ces ligands se lient aussi à d'autres types de récepteurs monoaminergiques (e.g. alpha adrénergiques ou dopaminergiques). Avec le développement d'antagonistes plus sélectifs, il est possible de discriminer les sous-types de récepteurs 5-HT₂ de manière plus précise (Baxter et al., 1995). Par exemple, le MDL 100907 est un antagoniste puissant et sélectif de récepteurs 5-HT_{2A} présentant une faible affinité pour la 5-HT_{2C}. Des études montrent que l'inhibition des neurones 5-HT du NDR induite par une administration systémique de DOI (un agoniste préférentiel des récepteurs 5-HT_{2A}), est partiellement atténuée par le MDL 100907 chez le rat anesthésié (Bergqvist et al., 1999; Martin-Ruiz et al., 2001 ; Boothman et al., 2003 ; Sharp et al., 2007). La région cérébrale impliquée dans les effets inhibiteurs du DOI sur l'activité électrique des neurones 5-HT n'est pas clairement identifiée. L'ensemble des travaux menés par l'équipe du Pr Artigas en Espagne montrent que cet effet inhibiteur ne passe pas par

l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} situés dans la couche V du cortex préfrontal médian puisque une application locale de DOI stimule, au contraire, le firing des neurones 5-HT chez le rat (Martin-Ruiz et al., 2001) ou la souris (Bortolozzi et al., 2003 ; Amargos-Bosch et al., 2004). En accord avec ces résultats, l'injection locale de DOI dans le cortex préfrontal médian augmente les concentrations extracellulaires corticales de 5-HT en microdialyse chez le rat ou la souris éveillé (Amargós-Bosch et al., 2004). En revanche, une des régions susceptibles de participer aux effets inhibiteurs du DOI pourrait être le locus coeruleus qui expriment les récepteurs 5-HT_{2A} sur les interneurons GABAergiques et dont l'activation réduit l'activité électrique des neurones sérotoninergiques (Szabo et Blier, 2001). Or comme les neurones noradrénergiques sont connus pour exercer une tonus excitateur sur l'activité des neurones 5-HT dans le NDR via les récepteur alpha-1 adrénergiques (Mongeau et al., 1997), il a été proposé que l'effet inhibiteur de l'administration systémique du DOI sur l'activité sérotoninergique résulterait d'une atténuation du contrôle excitateur noradrénergique. Toutefois, l'observation que le DOI augmente les concentrations extracellulaires de noradrénaline dans le cortex frontal de rat (Gobert et Millan, 1999), n'est pas en accord avec cette hypothèse.

De manière intéressante, les études de microdialyse intracérébrale *in vivo* ont également montré que le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} potentialise les effets des ISRS sur les concentrations extracellulaires de 5-HT dans le cortex frontal ou l'hippocampe chez le rat (Millan et al., 2003b ; Marek et al., 2005 ; Huang et al., 2006 ; Silver et al., 2011) laissant bien entrevoir un rôle inhibiteur des récepteurs 5-HT_{2A} sur l'activité des neurones sérotoninergiques. De manière surprenante, à ce jour, aucune étude n'a évalué les effets des ISRS à l'aide de la technique de microdialyse chez des souris mutantes privées du récepteur 5-HT_{2A}.

2.3. Les hétérorécepteurs 5-HT_{2C}

1) Variations génétiques du récepteur 5-HT_{2C}

Le récepteur 5-HT_{2C} subit une édition pré-ARNm par des enzymes désaminases avec la possibilité de produire 14 isoformes différentes du récepteur (Burns et al., 1997; Fitzgerald et al., 1999). Cette réaction est catalysée par deux enzymes: l'adénosine désaminase ARN-dépendante 1 et 2 (ADAR1 et ADAR2) dans des sites désignés A, B, C', E, C et D qui peuvent altérer la capacité du récepteur à activer la phospholipase C (PLC). Cette édition peut changer jusqu'à trois triplets de codons avec le potentiel de créer 24 isoformes différentes. Les modifications peuvent survenir sur 5 sites d'acides aminés 156, 158 et 160 de la forme non éditée « INI » (5-HT_{2C}-INI) à la forme appelée « VGV » (5-HT_{2C}-VGV) dans la région N-terminale de la deuxième boucle intracellulaire. Cette région est une sous région hautement conservée (motif «DRY») présente dans de nombreux récepteurs couplés aux protéines G (Herrick-Davis et al., 1999 ; Berg et al., 2001) (**Figure 6**).

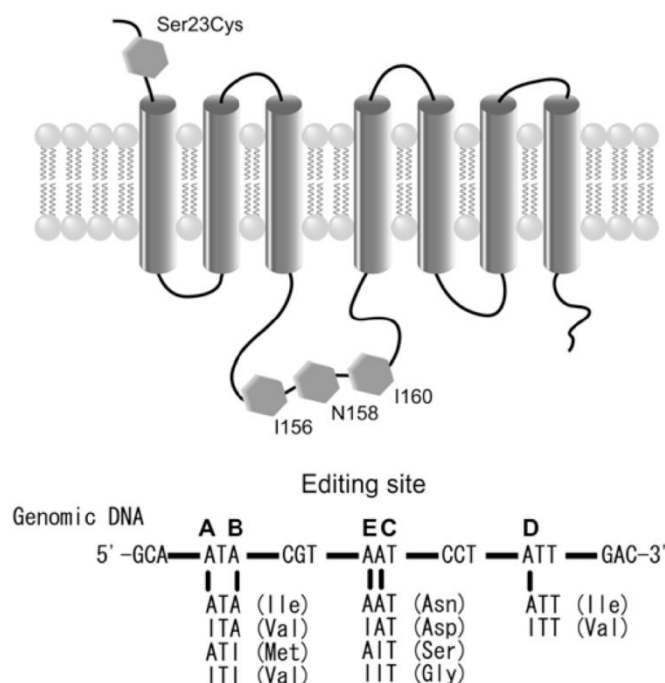


Figure 6 : Structure et édition de l'ARN du récepteur 5-HT_{2C}

La partie supérieure du schéma représente le motif DRY du récepteur 5-HT_{2C} tandis que la partie inférieure du schéma représente les sites possibles d'édérations de la séquence de l'ADN génomique. (D'après Iwamoto et al., 2009).

L'édition des ARNm du récepteur 5-HT_{2C} peut conduire à une diminution d'un facteur 10 à 15 de l'efficacité de l'interaction avec la protéine G associée (Burns et al., 1997). En particulier, l'édition de deux de ces sites (C' et C) est indispensable pour diminuer l'efficacité du récepteur à activer une protéine G (Niswender et al., 1999; Wang et al., 2000). L'édition de l'ARN est impliquée dans la diminution de l'activité basale du récepteur, et de son affinité vis à vis des agonistes du récepteur comme le RO60-0175 (Herrick-Davis et al., 1999). Gurevich et collaborateurs (2002) ont montré que chez les victimes de suicide ayant des antécédents de dépression majeure :

- * l'édition du site C' est augmentée,
- * l'édition du site D est diminuée
- * l'édition du site C est augmentée.

Ces résultats indiquent une diminution globale de l'activité du récepteur 5-HT_{2C} chez les patients atteints de dépression (Gurevich et al., 2002). Le traitement chronique avec la fluoxétine chez la Souris induit des changements de l'édition des sites C', C et D (Barbon et al., 2011). Ces résultats sont opposés aux éditions observées chez les victimes de suicide (Dracheva et al., 2008). En outre, une activation massive des récepteurs 5-HT_{2C} conduit à l'augmentation de l'édition des pré-ARNm dans les sites qui sont les moins efficaces pour aboutir au codage des isoformes activatrices des protéines G (Gurevich et al., 2002).

2) Distribution

Les densités les plus élevées du récepteur 5-HT_{2C} chez l'Homme et le Rongeur sont retrouvées dans le plexus choroïde, tandis qu'une distribution plus faible se retrouve dans le cortex cérébral, l'hippocampe, l'amygdale, le striatum et la substance noire (Baxter et al., 1995; Lucas et Spampinato, 2000; Leysen, 2004). Ces récepteurs sont localisés sur les neurones GABA, glutamateriques et dopaminergiques, où ils agissent comme hétérorécepteurs somatodendritiques (Baxter et al., 1995; Hoyer et al., 2002; Leysen, 2004). L'activation des récepteurs 5-HT_{2C} provoque une dépolarisation des neurones dans plusieurs régions cérébrales soulignant le fait que ce sont des récepteurs excitateurs.

3) Couplage des récepteurs 5-HT_{2C}

Le récepteur 5-HT_{2C} est couplé à une protéine G_q (Burns et al., 1997; Fitzgerald et al., 1999) qui stimule la cascade de la PLC comme décrit précédemment pour le récepteur 5-HT_{2A}. Une des particularités majeures de ce récepteur repose sur le fait qu'il possède une activité constitutive c'est à dire qu'il est capable de stimuler des voies de signalisations intracellulaires et des réponses biologiques *in vivo* en absence de fixation de ligands endogènes ou exogènes (Berg et al., 2005). Par exemple, des études de microdialyse montrent qu'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} tel que le SB242084, administré seul et de façon systémique, est capable d'augmenter significativement les concentrations extracellulaires de dopamine dans le cortex frontal, le noyau accumbens et le striatum (Gobert et al., 2000 ; De Deurwaerdère et al., 2001 ; De Deurwaerdère et al., 2004 ; Navailles et al., 2008 ; Leggio et al., 2011) tandis que leurs effets persistent chez des animaux présentant une lésion du système sérotoninergique et donc un déficit de ligand endogène. Ces résultats ont permis de démontrer une activité constitutive du récepteur 5-HT_{2C} et de distinguer ce processus d'une activation tonique du récepteur. De manière intéressante, une étude récente de l'équipe du Dr Meltzer a montré qu'il n'y avait pas de différence significative des concentrations basales de la dopamine chez les souris KO 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} comparé aux souris contrôles (Huang et al., 2011). Il est donc possible que des mécanismes compensatoires se mettent en place chez ces souris mutantes, empêchant la mise en évidence d'une activité constitutive notamment sur le contrôle du tonus dopaminergique.

4) Les récepteurs 5-HT_{2C} dans les troubles anxio/dépressifs

a) Etudes comportementales

Plusieurs études ont montré l'influence des récepteurs 5-HT_{2C} sur l'anxiété (Graeff et al., 1996; Millan et al., 2003a; Iwamoto et al., 2009). En effet, des agonistes de ce récepteur tels que le RO600175, le WAY-163909, le méta-chlorophenylpiperazine (mCPP) induisent un phénotype anxieux (Griebel et al., 1997; Millan et al., 2003a). Au contraire, des effets anxiolytiques ont été observés suite à l'administration d'antagonistes comme le SB206553 et le SB247853 (Griebel et al., 1997; Wood et al., 2001; Martin et al., 2002; Millan et al., 2003a) et le SB242084 (Knapp et al., 2004 ; Christianson et al., 2010). Un travail récent réalisé au laboratoire montre que l'agomélatine, un nouvel antidépresseur présentant, entre autre, la

propriété de bloquer les récepteurs 5-HT_{2C}, reverse le phénotype anxio/dépressif dans un modèle murin de la pathologie (Rainer et al., 2011). La localisation du récepteur 5-HT_{2C} dans les structures limbiques en fait une cible privilégiée dans l'étiologie et le traitement de la dépression. Il est d'ailleurs intéressant de noter que le récepteur 5-HT_{2C} possède une densité et une fonction augmentée dans divers modèles animaux de dépression, mais également chez le patient dépressif (Fone et al., 1996; Heslop et Curzon, 1999; Iwamoto et Kato, 2003; Yang et al., 2004 ; Calcagno et al., 2009 ; Calcagno et Invernizzi, 2010). En accord avec ces résultats, une étude récente montre que le WAY161503, un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}, entraîne des réponses de type « dépressiogène » chez la souris (Diaz et Maroteaux, 2011). Les souris mutantes qui n'expriment pas le gène codant pour le récepteur 5-HT_{2C} (souris «Knock-out») sont obèses, en rapport avec des troubles du comportement alimentaire et présentent également des altérations cognitives et locomotrice (hyperlocomotion) (Tecott et al., 1995). L'hyperphagie observée chez ces animaux est très certainement liée à une adaptation résultant de la délétion constitutive du récepteur puisque les antagonistes du récepteur 5-HT_{2C} ne reproduisent pas ces effets (Tecott et al., 1995; Leysen, 2004). Enfin, elles présentent une sensibilité élevée à la privation de sommeil, impliquant une participation active de ces récepteurs dans le rôle de la sérotonine sur le sommeil (Frank et al., 2002).

b) Rétrocontrôle du système sérotoninergique par les hétérorécepteurs 5-HT_{2C}
en conditions basales et en réponses aux ISRS

Chez le Rat, contrairement aux effets des antagonistes, des études neurochimiques ont montré des effets inhibiteurs de la stimulation du récepteur 5-HT_{2C} sur la libération de dopamine et noradrénaline dans le striatum et le noyau accumbens (De Deurwaerdere et Spampinato, 1999; Lucas et Spampinato, 2000; Leysen, 2004; Fink et Gothert, 2007). D'autres études physiologiques et comportementales ont montré que la stimulation du récepteur 5-HT_{2C} chez le Rongeur favorise la libération neuroendocrinienne (prolactine et ACTH), l'hyperthermie, l'hypophagie, les comportements locomoteurs (hypolocomotion et dyskinésie verbale) et les comportements sexuels (Hoyer et al., 2002; Giorgetti et Tecott, 2004; Leysen, 2004). Ils contrôlent également certains comportements émotionnels (anxiogénèse) (Giorgetti et Tecott, 2004; Leysen, 2004) et la perception douloureuse (Kayser et al., 2007).

Des études récentes de microdialyse *in vivo* ont montré que l'administration d'un ISRS avec un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2C} augmente les [5-HT]_{ext} et diminue les [GABA]_{ext} dans l'hippocampe ou le cortex frontal chez le rat ou la souris éveillé (Cremers et al., 2004 ; Thomas et al., 2007 ; Calcagno et Invernizzi, 2010). Cependant, le mécanisme à l'origine de ces changements neurochimiques reste complexe, car les récepteurs 5-HT_{2C} ne sont pas directement situés sur les neurones sérotoninergiques centraux comme les récepteurs 5-HT_{1A}/5-HT_{1B}. Il est désormais accepté que les récepteurs 5-HT_{2C} sont des hétérorécepteurs exprimés sur les neurones GABAergiques (Serrats et al., 2005 ; Calcagno et Invernizzi, 2010) ou glutamatergiques (Winter et al., 2005 ; Cremers et al., 2007). Des études d'électrophysiologie *in vivo* chez le rat anesthésié ont montré que des agonistes des récepteurs 5-HT_{2C} tels que le WAY161503, le Ro600175 ou le mCPP inhibent la décharge électrique des neurones sérotoninergiques tandis que ces effets sont bloqués par des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2C} dont le SB 242084 (Boothman et al., 2006 ; Sharp et al., 2007 ; Quérée et al., 2009). Par conséquent, il est possible que l'activation des récepteurs 5-HT_{2C} situés sur les interneurons GABAergiques exercent une inhibition tonique indirecte sur l'activité des neurones du locus coeruleus (Szabo et Blier, 2002) et de l'aire tegmentale ventrale (Di Giovanni et al., 1999; Di Giovanni et al., 2000; Gobert et al., 2000; Millan et al., 2000a). Or comme ces voies, exercent une influence excitatrice sur les neurones sérotoninergiques, leur inhibition associée à des propriétés antidépressives (Goodwin, 1997; Andreoli et al., 2002; Payne et al., 2002) pourrait participer aux effets indirects inhibiteurs des agonistes des récepteurs 5-HT_{2C} sur les neurones sérotoninergiques. Enfin, il a été montré qu'un traitement chronique d'ISRS (fluoxétine, clomipramine, paroxétine), diminue l'activité fonctionnelle des récepteurs 5-HT_{2C} chez le Rat et chez l'Homme (Kennett et al., 1994; Maes et al., 1997; Quested et al., 1997; Cowen, 1998; Bristow et al., 2000; Van Oekelen et al., 2003) laissant entrevoir une capacité de désensibilisation de ces récepteurs en réponse aux antidépresseurs.

3. Le transporteur de la sérotonine

3.1. Structure et fonctionnement du transporteur de la sérotonine

L'existence d'une activité de transport de la 5-HT a été démontrée pour la première fois sur la membrane des plaquettes sanguines (Hughes et Brodie, 1959 ; Weissbach et al., 1960). Du fait de cette propriété particulière, les plaquettes sanguines humaines ont été pendant longtemps utilisées comme modèle de neurones 5-HT centraux. Ceci était lié aussi à l'absence de techniques permettant d'étudier l'activité de ces neurones chez un individu vivant et de suivre l'évolution d'un paramètre au cours du temps. En effet, seule l'étude du tissu cérébral en *post mortem* était alors possible chez l'Homme, les techniques non invasives d'imagerie cérébrale n'étant pas encore disponibles.

Le clonage de l'ADNc du transporteur de la 5-HT (SERT) a été réalisé chez le Rat en utilisant une stratégie basée sur l'homologie de séquence avec le transporteur de la noradrénaline (Blakely et al., 1991). L'ADNc du SERT a ensuite été cloné chez l'Homme (Lesch et al., 1993) (**Figure 7**), le rat (Molteni al., 2009) et la Souris (Chang et al., 1996). L'homologie de séquence entre le SERT humain et celui du rat est de 92%, avec toutefois d'importantes différences dans la région N-terminale. L'homologie est de 94% entre le SERT humain et le SERT de Souris (Chang et al., 1996).

La structure moléculaire du SERT comporte douze segments transmembranaires constitués de 25 acides aminés hydrophobes chacun et une grande boucle extracellulaire, entre les domaines transmembranaires 3 et 4, comportant des sites de N-glycosylation. Des sites de phosphorylation par les protéines kinases A et C sont également présents dans la séquence du SERT (Torres et al., 2003). Il a d'ailleurs été montré que la phosphorylation de ces sites entraîne des modifications de l'affinité de SERT pour la 5-HT et de son activité de transport.

La fixation d'une molécule de 5-HT sur le transporteur favorise un co-transport d'un ion sodium Na^+ et d'un ion chlorure Cl^- pour assurer la formation d'un complexe quaternaire. Une fois ce complexe formé, un changement de conformation du transporteur permet à la 5-HT, à un ion Na^+ et à un ion Cl^- d'être transloqués de l'extérieur du neurone vers l'intérieur du neurone ou de la plaquette sanguine. Les études réalisées sur des fibroblastes surexprimant le SERT murin montrent que l'ion Cl^- facilite la fixation de la 5-HT tandis que l'ion Na^+

permet la translocation de la 5-HT fixée sur SERT (Chang et Lam, 1998). A la suite de ces évènements, un ion potassium K^+ intracellulaire est transloqué de l'intérieur du neurone vers l'extérieur où il se dissocie du transporteur. Ce co-transport est un processus actif faisant intervenir une pompe Na^+/K^+ ATPase.

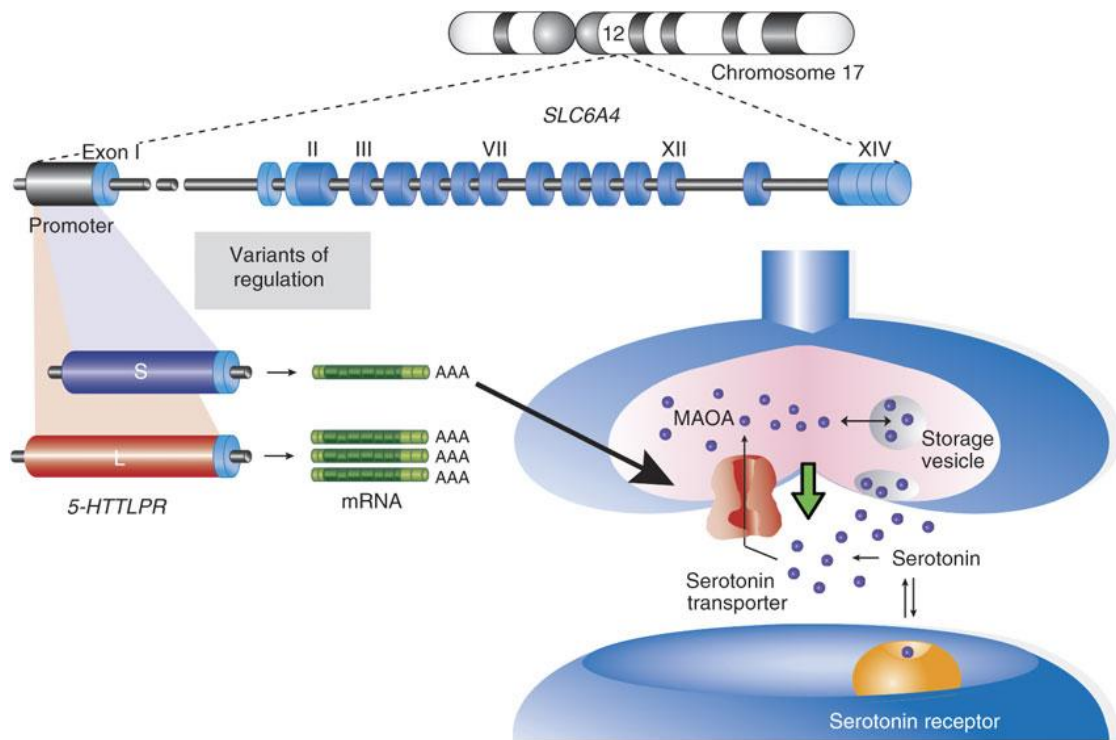


Figure 7 : Structure du gène codant pour le transporteur de la sérotonine humain (D'après Lesch et al., 1993)

3.2. Distribution dans le système nerveux central

Dans le SNC, le transporteur de la 5-HT a été localisé spécifiquement dans les structures cérébrales riches en terminaisons neuronales sérotoninergiques (Aghajanian et Bloom, 1967 ; Habert et al., 1985; D'Amato et al., 1987; Qian et al., 1995), c'est-à-dire sur la membrane plasmique des neurones sérotoninergiques. Le SERT est également retrouvé sur la membrane des corps cellulaires du NRD et des fibres axonales sérotoninergiques (Zhou et al., 1998).

Chez le Rat, la distribution du SERT, a été réalisée par des études d'autoradiographie quantitative en utilisant de la [³H]paroxétine ou de la [³H]fluoxétine qui montrent une plus forte densité du transporteur sérotoninergique dans le noyau du raphé dorsal, les noyaux basolatéraux de l'amygdale et le cerveau médian (Hrdina et al., 1990 ; Kovacevic et al., 2010).

Les études *post-mortem* chez l'Homme utilisant soit de la [³H]paroxétine, soit du [³H]citalopram montrent une distribution du SERT généralement similaire à celle trouvée chez le Rat (Cortes et al., 1988; Duncan et al., 1992 ; Dean et al., 2003), même si des différences régionales apparaissent entre les deux espèces.

Enfin, chez la Souris, la distribution du SERT dans le SNC observée sur des coupes de cerveaux incubées dans du [¹²⁵I]RTI-55 et utilisant la technique d'hybridation *in situ* montre que la plus grande densité d'ARNm codant pour le SERT est localisée dans le noyau du raphé médian (Bengel et al., 1997 ; Gould et al., 2011).

3.3. Pharmacologie du transporteur de la sérotonine

Le SERT humain possède une affinité relativement élevée ($K_m = 460$ nM) pour la 5-HT (Barker et Blakely, 1996). Les transporteurs sérotoninergiques sont la cible privilégiée des antidépresseurs (i.e., clomipramine, fluoxétine, etc...), de médicaments anorexigènes (d-fenfluramine) et de certaines substances addictives [cocaïne, amphétamine et dérivés comme le 3,4-méthylénédioxyméthamphétamine (NMDA, ecstasy)] (Serretti et al., 2005). Cependant, les antidépresseurs bloquent le processus de recapture assuré par le transporteur permettant l'accumulation de la 5-HT endogène dans l'espace intra-synaptique. Cependant, les drogues comme l'amphétamine utilisent le SERT en mode inverse pour faire sortir la 5-HT de l'intérieur du neurone (terminaisons neuronales) vers la fente synaptique selon un processus de « libération » de la 5-HT qui est dit Ca^{2+} indépendant (par opposition à la libération classique de 5-HT (ou « release ») qui est un processus Ca^{2+} dépendant). L'inhibition de la capture de la 5-HT par un antidépresseur, est la conséquence d'une liaison compétitive de haute affinité de ce médicament avec un seul site du transporteur, empêchant ainsi la liaison de la 5-HT sur son site de reconnaissance (Olivier et al., 2000 ; Perona et al., 2008). Le fonctionnement du transporteur de la 5-HT serait donc altéré dans de nombreuses maladies du

SNC comme les troubles obsessionnels compulsifs, le trouble panique (Olivier et al., 2000) ou la dépression (Lesch, 2001).

3.4. Souris génétiquement modifiées pour le SERT : études de pharmaco-génétiques

Les souris génétiquement modifiées pour le transporter SERT (souris homozygotes SERT^{-/-} ou hétérozygotes SERT^{+/-}) ont été obtenues par recombinaison homologue : une séquence d'ADN contenant des domaines existant dans le génome de la souris est introduite dans des cellules souches embryonnaires ES permettant ainsi une intégration de cette séquence par un processus de recombinaison homologue (Hall et al., 2009). Les souris hétérozygotes représentent un modèle pertinent du polymorphisme humain (Guiard et al., 2011). En effet, chez l'homme un polymorphisme a été identifié avec un allèle « s » (short) et « l » (long). Il y a maintenant des preuves solides prouvant que l'allèle « s » confère une plus grande susceptibilité au développement de la dépression, activée par un stress soutenu (Caspi et al., 2003). Ces résultats ont été confirmés récemment dans une méta-analyse incluant l'ensemble des études rapportées (Karg et al. 2011). Bien que l'analyse *post-mortem* des tissus cérébraux humains ait dans un premier temps échoué dans la détection de corrélations entre les génotypes du SERT et sa densité (Mann et al., 2000; Parsey et al., 2006), les études de PET les plus récentes utilisant le [¹¹C]-3-amino-4(2-diméthylamino-méthyl-phenylsulfanyl)-benzonitrile ou [¹¹C] DASB, un ligand sélectif de SERT, ont montré une augmentation de sa liaison au SERT chez les sujets homozygotes pour l'allèle L (Willeit & Praschak-Rieder, 2010). Des études fonctionnelle *in vitro* de l'activité du gène SERT sur des lymphoblastes ou des plaquettes ont montré que l'allèle L est associé à des taux d'activité transcriptionnelle et des taux de capture de 5-HT environ 2 fois plus élevés chez les patients présentant l'allèle « L » comparé à ceux présentant l'allèle « S » (Lesch et al., 1996 ; Greenberg et al., 1999). Ces résultats sont cohérents avec les données montrant que les niveaux d'ARN messager et l'expression du SERT sont plus élevés chez l'homme sain ou sur des cerveaux d'homozygotes LL par rapport aux transporteurs S (Little et al., 1998 ; Heinz et al., 2000; Juhasz et al., 2003). Analysées dans leur ensemble, ces études suggèrent que les allèles L et S du gène SERT régulent l'expression du transporteur SERT. Étant donné que les ISRS agissent en bloquant le SERT, l'hypothèse que la variation allélique du gène SERT modifie la réponse aux ISRS a été soulevée. À ce jour, les résultats des 37 études pharmacogénétiques ont été rapportés (Kato & Serretti, 2010) et 18 d'entre elles démontrent clairement que les patients présentant l'allèle L ont une meilleure réponse aux ISRS que les

patients S/S ou S/L soit en terme de délai d'action ou de pourcentage de réponses positives (fluvoxamine: Kim et al., 2000; Serretti et al., 2004; Smeraldi et al., 2006; Zanardi et al., 2001b; paroxétine: Bozina et al., 2008; Ruhe et al., 2009; fluoxétine: Kim et al, 2000; Yu et al 2002; sertaline: Durham et al 2004; Hong et al 2006; citalopram: Arias et al., 2003; escitalopram: Margoob et al., 2008 ; Huezo-Diaz et al., 2009).

D'un point de vue mécanistique, les raisons d'une meilleure réponse chez les patients homozygotes L/L restent peu connues. Une étude récente chez des souris SERT+/+ et SERT+/- comme modèle du polymorphisme humain (respectivement L/L et S/L), montre que la présence du SERT chez les souris contrôles SERT+/+ favorise une augmentation de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques induite par l'administration chronique de escitalopram comparée aux souris SERT+/- (Guiard et al., 2011). En revanche, l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe des souris contrôles SERT+/+ induite par le traitement chronique de escitalopram est plus faible que celle observée chez les souris SERT+/- laissant entrevoir des mécanismes complexes dans la réponse aux ISRS en rapport avec le polymorphisme du SERT (Guiard et al., 2011). Il a été proposé que la forte augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT mesurées dans les régions terminales chez les souris SERT+/- traitées avec le escitalopram pourrait favoriser la mise en route de systèmes inhibiteurs « contre-productifs » ayant un effet délétère sur le système sérotoninergique. Cet effet délétère serait moins marqué chez les souris SERT+/+ présentant une neurotransmission sérotoninergique plus modérée.

3.5. Les autres moyens de transport de la sérotonine

1) La recapture hétérologue

Le clonage et le séquençage des transporteurs monoaminergiques révèlent que cette famille présente un haut degré d'homologie structurale (Torres et al., 2003 ; Gether et al., 2006). Cela peut expliquer, du moins en partie, le fait que les ISRS, en dépit d'une sélectivité proclamée *in vitro*, peuvent augmenter non seulement la neurotransmission sérotoninergique, mais aussi noradrénergique et dopaminergique en bloquant le NAT et le DAT *in vivo*. Il est également possible que les monoamines, dans certaines conditions, puissent être recaptées par des transporteurs pour lesquels elles ont une plus faible affinité. En accord avec cette

hypothèse, Vizi et collaborateurs (2004) ont montré précédemment que la recapture de NA est réduite, mais pas complètement abolie, dans l'hippocampe et le cortex frontal chez la souris NAT^{-/-}. L'observation d'une recapture résiduelle diminuée en présence du escitalopram chez ces souris NAT^{-/-}, suggère que la NA peuvent être recaptée par les varicosités sérotoninergiques par l'intermédiaire du SERT. Ceci pourrait ainsi expliquer que les ISRS, en bloquant cette recapture hétérologue *in vivo*, peuvent également augmenter les concentrations extracellulaires de NA en microdialyse dans l'hippocampe et le cortex frontal des souris KO NAT (Vizi et al., 2004).

2) La recapture de la 5-HT par les OCT ou les PMAT

Une nouvelle famille de transporteurs monoaminergiques de faible affinité a été récemment identifiée. Ces transporteurs appelés « Organic Cation Transporter (OCT) » ou « Plasma Membrane Transporter (PMAT) » ont la particularité de recapter les monoamines avec une faible sélectivité que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (OCT) (Engel et al., 2004 ; Engel et Wang, 2005 ; Bacq et al., 2011). Les affinités de ces transporteurs *in vitro* pour les monoamines sont de l'ordre du millimolaire (mM) et varient selon le type de transporteur et l'espèce étudié (Amphoux et al., 2006).

Des études ont montré que les OCT peuvent participer à la recapture *in vitro* (Bunin et Wightman, 1998 ; Daws, 2009) ou *in vivo* (Bacq et al., 2011) de la 5-HT. De même, PMAT semble également participer au transport de la 5-HT avec une meilleure efficacité (Duan et Wang, 2010), mais cette propriété n'a pas encore été démontrée *in vivo*.

La figure 8 montre qu'en absence d'inhibiteurs de recapture, le transport de la 5-HT est assuré principalement par le transporteur de haute affinité SERT (*flèches pleines*), avec une contribution mineure des autres transporteurs membranaires (*flèches en pointillées*). Lorsqu'un ISRS est présent, le transporteur SERT est bloqué mais la recapture de la 5-HT peut être maintenue par l'intermédiaire des autres transporteurs : les transporteurs de faible affinité situés sur les neurones voisins (NAT, DAT, OCT ou PMAT) ou sur les cellules gliales (OCT et des transporteur "uptake 2 ") (*flèches sombre en pointillées*) (Schroeter et al., 2000; Miner et al., 2000, 2003; Liprando et al., 2004 ; Fuxe et al., 2007 ; Daws, 2009). Des mécanismes similaires de recapture de la 5-HT peuvent se produire lorsque l'expression ou la

fonction du SERT est génétiquement réduite (par exemple, chez la souris mutée SERT^{-/-}) (Daws, 2009).

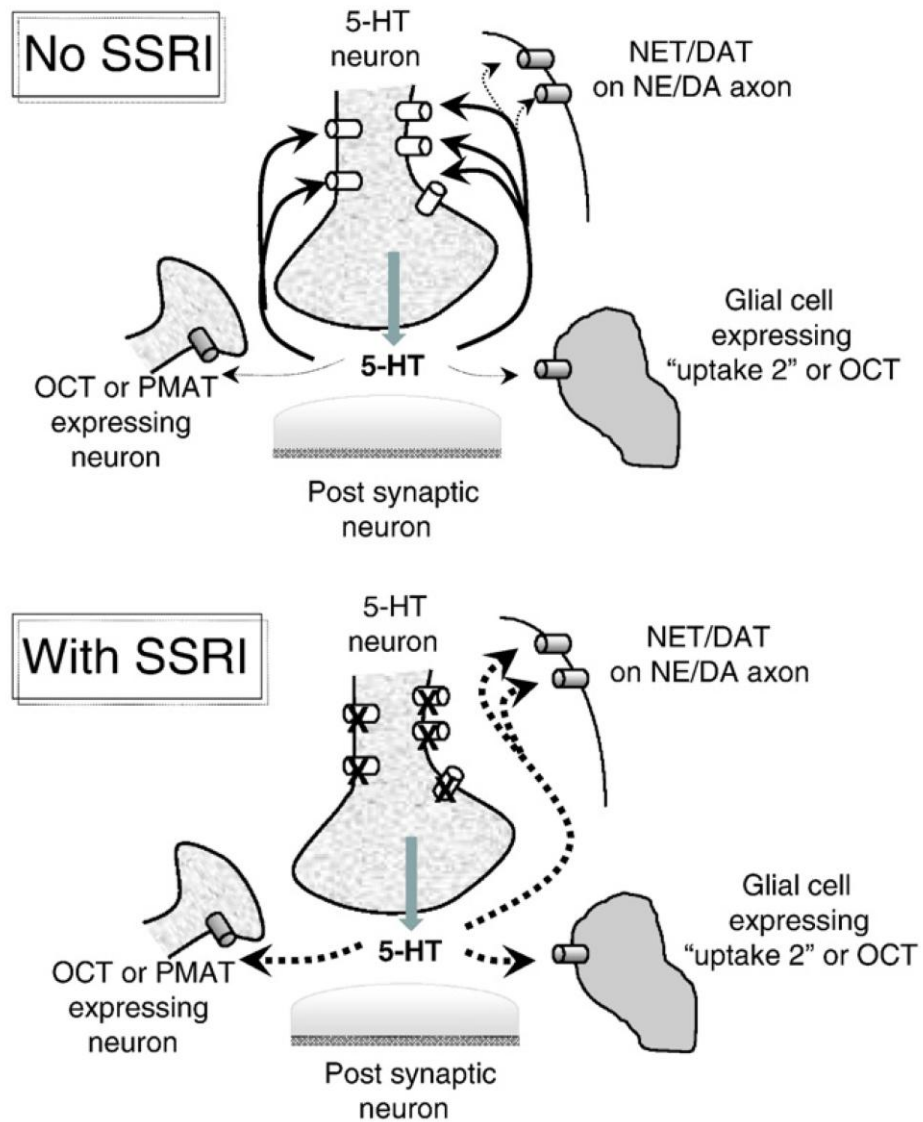


Figure 8 : Différents systèmes de recapture de la sérotonine par le SERT, le NAT/DAT et les OCT/PMAT. (D'après Daws, 2009).

B. LA DEPRESSION MAJEURE ET LES TRAITEMENTS

1. Les symptômes de la dépression

Le syndrome dépressif se caractérise par un état de souffrance psychique et des troubles de l'humeur, associés à une inhibition psychomotrice et d'autres symptômes tels que défini par le manuel de diagnostique et statistique des troubles mentaux (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders : DSM IV) (**Tableau 6**).

Critères spécifiques	Humeur dépressive Diminution de l'intérêt et du plaisir Sentiment de culpabilité ou manque de valorisation de soi Pensées de mort et de suicide récurrentes
Critères non spécifiques	Agitation ou ralentissement psychomoteur Fatigue et/ou perte d'énergie Perte d'appétit et de poids d'au moins 5% par mois Trouble de l'attention et/ou de concentration Insomnie (ou hypersomnie, plus rare)

Tableau 6 : Diagnostic de la dépression selon le DSM IV

Pour confirmer le diagnostic de dépression, la présence d'au moins 5 de ces critères (perdurant depuis au moins 15 jours) est nécessaire dont au moins 2 parmi les critères spécifiques.

L'hétérogénéité des manifestations des troubles de l'humeur est source de difficulté pour établir le diagnostic de la pathologie chez les patients mais également un obstacle en recherche préclinique si l'on souhaite développer des modèles animaux pertinents. Ainsi différentes formes de dépression, aux manifestations parfois opposées, ont été identifiées tels qu'une la dépression mélancolique ou une dépression atypique (Prins et al., 2011) (**Tableau 7**).

Troubles dépressive	
Dépression mélancolique	Dépression atypique
<i>Les principaux symptômes dans le DSM-IV</i> (soit un, ou les deux doivent être présents) - Dysphorie (humeur dépressive) - Anhédonie (perte de plaisir)	
<i>Sous-symptômes DSM-IV par sous-types</i>	
- Perte de poids - Perte d'appétit - Insomnie/moins de sommeil - Agitation psychomotrice - Pensées suicidaires	- Gain de poids - Augmentation de l'appétit/Hyperphagie - Hypersomnie/plus de sommeil - Fatigue/perte d'énergie - Retard psychomoteur
<i>Sous-symptômes DSM-IV présents dans les deux sous-types</i>	
- Sentiments d'inutilité et de culpabilité - Diminution de l'aptitude à penser ou à se concentrer	
<i>Symptômes neurobiologiques par sous-types</i>	
Dépression mélancolique	Dépression atypique
- Anxiété - Insensibilité à l'environnement - Symptômes accentués dans la matinée - Augmentation de l'activité sympathique - Hyperactivité de l'axe HPA - Activation de la synthèse du CRF - Susceptibilité accrue aux infections	- Léthargie - Réactivé à l'environnement - Symptômes améliorés dans la matinée - Diminution de l'activité sympathique - Hypoactivité de l'axe HPA - Inhibition de la synthèse du CRF - Susceptibilité accrue à l'inflammation

Tableau 7 : Principaux symptômes distinguant une dépression mélancolique ou d'une dépression atypique (D'après Prins et al., 2011).

2. Hypothèse neurobiologique de la dépression

2.1. Hypothèse monoaminergique

La principale hypothèse monoaminergique de la dépression est la plus ancienne des hypothèses. Elle découle de la découverte dans les années 50 des propriétés correctrices de

l'humeur dépressive de l'iproniazide, un inhibiteur de la monoamine oxydase (IMAO) ou des antidépresseurs dérivés de l'imipramine appelés aussi antidépresseurs tricycliques (TCA) (Eriksson, 2000) capables d'augmenter les concentrations cérébrales de 5-HT et/ou de NA dans le cerveau (Bunney et Davis, 1965; Schildkraut, 1965; Coppen, 1967; Beskow et al., 1976). Au contraire, chez les patients souffrant d'hypertension, l'utilisation de la réserpine, connue pour libérer les stocks de monoamines entraînait chez 15% d'entre eux des épisodes dépressifs majeurs (Cocco et Aqué, 1977). Plus récemment des études d'imagerie ou de génétique (études de polymorphismes) réalisées chez les patients déprimés ont conforté cette hypothèse monoaminergique, mettant en évidence différentes modifications d'expression et/ou de fonction de certains éléments clés de la régulation du système sérotoninergique central tels que le transporteur de la sérotonine (SERT), les enzymes de synthèse (tryptophane hydroxylase de types 1 et 2) ou de dégradation (monoamines oxydases, MAOs) mais également les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} (Savitz et Devrets, 2009 ; Porcelli et al., 2011) dans la qualité de réponse aux ISRS (**Tableau 8**).

	Protéine	Polymorphisme	Réponse aux ISRS
5-HT	TPH2	rs2171363	✓
	COMT	rs4680	✓
	MAO	rs1465108	✓
	SERT	5-HTTLPR	✓
	5-HT _{1A}	rs6295	✓
	5-HT _{2A}	rs6313	✓
Non-5-HT	SUβ3 Prot-G	rs5443	✓
	CRF-R1	rs242981	✓
	BDNF	rs6265	✓

Tableau 8 : Principaux éléments impliqués dans la régulation du système sérotoninergique dont le polymorphisme module l'activité thérapeutiques des ISRS (D'après Porcelli et al., 2011).

2.2. Hypothèses moléculaire et cellulaire de la dépression

Depuis une quinzaine d'années, une grande partie des hypothèses expliquant l'étiopathologie de la dépression souligne l'importance de la plasticité neuronale. La neuroplasticité correspond à un processus impliquant la production de nouvelles cellules (neurogenèse et gliogenèse), le développement de l'arborisation dendritique neuronale ainsi que l'enrichissement des connexions synaptiques. Cette hypothèse propose que la dépression majeure serait due à une diminution de la neuroplasticité et notamment du processus de neurogenèse hippocampique chez l'adulte, qui engendrerait des modifications morphologiques et structurales de certaines régions cérébrales (Jacobs et al., 2000; Sapolsky, 2000b; Duman et Newton, 2007). En effet, des études cliniques ont pu mettre en évidence une diminution du volume de l'hippocampe au cours d'un épisode dépressif (Sheline et al., 1999; Bremner et al., 2000; Steffens et al., 2000). Ces résultats sont corrélés à d'autres études d'imageries et à des examens *post-mortem* indiquant des atrophies ou des pertes de neurones dans l'hippocampe et le cortex préfrontal chez les patients déprimés (Sheline et al., 1996; Shah et al., 1998; Duman et Charney, 1999; Rajkowska et al., 1999). En outre, les antidépresseurs, administrés de manière chronique, contrecarrent certaines de ces altérations morphologiques (Czeh et al., 2001; Drevets et al., 2002; Drevets, 2003; Sheline et al., 2003; Neumeister et al., 2005; Fales et al., 2009). Cette hypothèse neurodégénérative de la dépression aurait comme acteur principal, un facteur neurotrophique, le « Brain Derived Neurotrophic Factor » (BDNF) (Duman et al., 1997; Duman et al., 2001) qui serait capable d'agir positivement sur la neurogenèse chez l'adulte en stimulant différentes étapes telles que la prolifération, la survie et la maturation des neurones hippocampiques (Delteil et al., 2009 ; Samuels et Hen, 2011). Par ailleurs, si le stress, via une augmentation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes provoque une atrophie, une augmentation de la mort neuronale, une diminution de l'arborisation dendritique et de la neurogenèse chez le rongeur ou le primate (Gould et al., 1998; McEwen, 1999; Pittenger et Duman, 2008), ces altérations peuvent être corrigées par l'administration chronique d'antidépresseurs (Mailliet et al., 2008) via la production de BDNF (Nibuya et al., 1995). Ensemble ces données pointent du doigt le processus de neurogenèse hippocampe adulte régulé par le BDNF, comme un mécanisme post-synaptique majeur impliqué dans l'efficacité des ISRS. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que l'ablation du processus de neurogenèse par irradiation aux rayons X chez l'animal adulte bloque les effets de type-antidépresseurs induits par les ISRS chez la souris (Santarelli et al., 2003 ; David et al., 2009). En dépit de ces avancées dans la compréhension

du mécanisme d'action des antidépresseurs sérotoninergiques, la nature des récepteurs post-synaptiques mis en jeu reste controversée. Il semble toutefois que les récepteurs post-synaptiques de types 5-HT_{1A} (Santarelli et al., 2003) et 5-HT₂ (Banasr et al., 2004) soient positivement liés à ce processus. Il est maintenant admis que la neurogenèse dans l'hippocampe adulte est certes un processus nécessaire, mais pas suffisant, à la survenue de certains effets des antidépresseurs.

2.3. Hypothèses endocrinienne de la dépression

Il existe une relation entre les maladies endocriniennes et la dépression, et de nombreuses données indiquent un mauvais rétrocontrôle négatif du système endocrinien dans la dépression (Papelbaum et al., 2010 ; Zuberi et al., 2011). Ces perturbations du système hormonal dans la dépression sont associées à une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (« hypothalamus-pituitary-adrenal », HPA axis) ou encore “axe du stress”. Des études cliniques chez l'Homme mettent en évidence des concentrations élevées de glucocorticoïdes plasmatiques (corticolémie) chez des patients souffrant de troubles dépressifs (Rubin et al., 1987). En parallèle, les concentrations d'hormone corticotrope («cortico-releasing hormone», CRH) dans le liquide céphalo-rachidien sont également élevées, ainsi que sa libération dans le système limbique (Raadsheer et al., 1994). L'administration d'un glucocorticoïde de synthèse, la dexaméthasone, permet de mettre en évidence une altération du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA chez ces patients dépressifs. Par exemple, chez un sujet sain, la dexaméthasone diminue la concentration des hormones du stress (CRH, l'adrénocorticotrophine ACTH, vasopressine), un effet qui est absent chez les patients dépressifs (Carroll, 1982). De plus, le retour à l'état normal de l'axe HPA est une condition nécessaire à la rémission clinique (De Bellis et al., 1993). Par conséquent, il semblerait que la perturbation de cet axe HPA soit un élément clef dans le diagnostic d'un état dépressif. Cet état de stress peut être modélisé chez l'animal en suivant un protocole de stress chronique qui induit une diminution du rétrocontrôle négatif exercé sur l'Axe HPA, lié à une altération des fonctions inhibitrices de l'hippocampe et du cortex préfrontal sur cet axe (Mizoguchi et al., 2003). En effet, ces structures possèdent de nombreux récepteurs aux corticostéroïdes et participent fortement à cette boucle de rétroaction négative. Un stress suffisamment important conduit à une dérégulation de l'axe HPA entraînant une forte sécrétion de cortico-releasing factor (CRF) et d'ACTH, et donc de glucocorticoïdes endogènes (appréciée par la mesure de la corticostéronémie chez l'animal). L'excès de

glucocorticoïdes est neurotoxique, provoquant des dommages dans l'hippocampe et le cortex préfrontal, d'où une altération du contrôle que ces régions cérébrales exercent sur l'axe HPA (Sapolsky, 2000a). Il est également possible d'induire un état de type anxio/dépressif chez le Rongeur en dérégulant cet axe HPA suite à l'administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson chez la souris (David et al., 2009). De tels modèles ont l'avantage de relier une perturbation neurochimique à une altération du comportement chez l'animal et de ce fait de permettre d'évaluer non seulement les propriétés antidépressives de nouvelles molécules mais également d'étudier leur mécanisme d'action au niveau cellulaire et moléculaire chez des souris WT contrôles ou chez des souris KO adultes.

3. Les traitements des troubles de l'humeur

3.1. Classification des antidépresseurs

Il existe 3 classifications possibles des antidépresseurs : (1) en fonction de leur structure chimique, (2) en fonction de leur activité thérapeutique et enfin (3) en fonction de leur mécanisme d'action. La classification mécanistique, que nous avons retenue, à l'avantage de regrouper les antidépresseurs en grandes classes. Selon la modulation de la transmission monoaminergique impliquée et leur affinité spécifique *in vitro* pour un des transporteurs monoaminergiques (Frazer, 2001, Owen et al., 2001) (**Tableau 9**). Cette classification comprend 5 classes d'antidépresseurs et permet en cas d'échec thérapeutique de changer de famille d'antidépresseurs bien que le mécanisme d'action des molécules ne résume pas leur pouvoir thérapeutique. La première catégorie comprend les antidépresseurs qui augmentent sélectivement la transmission sérotoninergique centrale. On y retrouve tous les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS). La seconde classe regroupe les antidépresseurs qui augmentent sélectivement la transmission noradrénergique centrale, dans laquelle on retrouve les inhibiteurs sélectifs du recapture de la noradrénaline (IRN). La troisième regroupe les antidépresseurs d'action mixte qui augmentent les transmissions sérotoninergique et noradrénergique centrale. Ces antidépresseurs appartiennent à la classe des inhibiteurs mixte de recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN). La quatrième regroupe les antidépresseurs qui augmentent les transmissions noradrénergique et dopaminergique (IRND). Enfin, la cinquième classe regroupe les antidépresseurs qui agissent simultanément sur les trois systèmes monoaminergiques centraux en bloquant le SERT mais

également le transporteur de la NA (NAT) et celui de la dopamine (DAT). Cette nouvelle classe d'antidépresseurs, la plus récente, constitue la classe des triples inhibiteurs de recapture (Guiard et al., 2009 ; Prins et al., 2011). Des molécules ayant des mécanismes innovants, ciblant par exemple certains récepteurs sérotoninergiques tels que l'agomélatine (antagoniste 5-HT_{2C}) ou les antipsychotiques atypiques ayant la capacité de bloquer les récepteurs 5-HT_{2A} et d'agir sur les récepteurs D₂ (aripiprazole, asenapine, trazodone, respiridone, onlazapine...) présentent un intérêt particulier qui sera brièvement abordé dans la dernière partie de ce mémoire. De manière intéressante, deux stratégies principales sont utilisées chez les patients dépressifs qui ne répondent pas à un traitement antidépresseur chronique. La première consiste à utiliser un nouvel antidépresseur qui appartient à une classe différente de celle utilisée en première intention. La seconde repose sur l'ajout d'une seconde molécule (stratégie de potentialisation). En effet, il est possible qu'un antidépresseur seul ne permette pas d'atteindre le seuil nécessaire pour obtenir une réponse tandis que le second permette de dévoiler son activité par une action synergique (Blier et Blondeau, 2011). Parmi ces stratégies de potentialisation, les antipsychotiques sont largement utilisés mais on trouve également d'autres molécules telles que le lithium, le bupropion, les tricycliques, la mirtazapine ou encore le pramipexole.

Classification	Nom des ADs	Affinités de liaison K _i (nM) pour les transporteurs de monoamines (<i>in vitro</i>)			Références
		5-HT	NA	DA	
ISRS (Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la 5-HT)	Escitalopram (Seroplex®)	1,1	7841	27410	Owen et al., 2001 ; Sanchez et al., 2003
	Citalopram (Ceropram®)	1,6	6190	16540	
	Fluoxétine (Prozac®)	1,1	599	3764	
	Paroxétine (Paxil®)	0,1	45	268	
	Fluvoxamine (Luvox®)	2,3	1427	16790	
	Sertraline (Zoloft®)	0,3	714	22	
IRS (Inhibiteurs sélectifs du recapture de la NA)	Atomoxétine (Strattera®)	77	5	1451	Gehlert et al., 1995
	R-Nisoxetine	158	0.5	378	
	Desipramine (Norpramine®)	179	4	10000	Millan et al., 2001 ; Koch et al., 2003
	Réboxétine	129	1.1	10000	
IRSN (Inhibiteurs mixtes de la recapture de la 5-HT et la NA)	Duloxétine (Cymbalta®)	8	45	300	Wong et al., 1988
	Minalcipran (Exel®)	123	200	10000	Koch et al., 2003
	Venlafaxine (Effexor®)	82	248	7647	Bymaster et al., 2001
IRND (Inhibiteurs mixtes de la recapture de la NA et la DA)	Bupropion (Zyban®)	19900	1500	600	Richelson et Pfenning, 1984
	Nomifensine (Alival®)	830	6.6	48	Arnt et al., 1985
IRSND (Inhibiteurs triples de la recapture de la 5-HT, la DA et la NA)	Indatraline	0.4	5.8	1.7	Hyttel et Larsen, 1985
	PRC200-SS	2.1	1.5	61	Liang et al., 2008
	JNJ-7925476	1	0.9	2.6	Maryanoff et al., 1987
	DOV216303	14	20	78	Skolnick et al., 2006

Tableau 9 : Classification des antidépresseurs ayant la propriété de bloquer un ou plusieurs transporteurs monoaminergiques, selon leur affinité pour ces transporteurs mesurée *in vitro*

3.2. Mécanisme d'action des antidépresseurs monoaminergiques

Les antidépresseurs exercent leurs effets thérapeutiques en agissant sur les systèmes monoaminergiques. Depuis la découverte des premiers antidépresseurs dans les années 50, l'importance accordée à chacun des neuromédiateurs incriminés a constamment évolué dans le temps, avec en parallèle la mise au point de molécules agissant soit sur les deux systèmes monoaminergiques, soit préférentiellement sur l'un ou l'autre des systèmes (Lêo al., 2004). Afin de restaurer les concentrations en monoamines dans le SNC qui seraient réduites chez les patients déprimés, les antidépresseurs utilisent trois principaux mécanismes d'action basés sur l'inhibition de la recapture **(1)**, de la dégradation de la 5-HT **(2)** ou du blocage d'un récepteur **(3)** du neurotransmetteur (Artigas et al., 2002) **(Figure 9)**. Après la mise sur le marché des premiers inhibiteurs non sélectifs de la monoamine oxydase (MAO), la découverte des deux isoformes A et B de cette enzyme, différant l'une de l'autre par leur affinité pour la 5-HT et la NA (la forme A) ou la DA (la forme B), a conduit à la commercialisation d'inhibiteurs sélectifs : les IMAO A (antidépresseurs) ou IMAO B (antiparkinsoniens). L'action de la molécule sur une cible thérapeutique autre que l'enzyme de dégradation, comme le transporteur monoaminergique, a permis de commercialiser de nouvelles classes de médicaments antidépresseurs. Ces molécules dont le mécanisme d'action est fondé sur l'inhibition de la recapture des monoamines qu'il s'agisse de la 5-HT, de la NA ou de la DA, restent les plus fréquemment utilisées. On a d'abord utilisé des inhibiteurs de la recapture de la 5-HT et de la NA comme l'imipramine et dérivés dont les effets indésirables ont permis d'identifier des molécules plus sélectives. C'est ainsi que sont apparues des molécules n'agissant que sur la recapture de la noradrénaline, telles que la désipramine ou la maprotiline puis les inhibiteurs de recapture de la sérotonine. Il existe enfin des molécules qui agissent essentiellement sur l'inhibition de la recapture de la dopamine, dont le bupropion commercialisé comme antidépresseur aux États-Unis. Aujourd'hui, on observe un retour progressif vers des molécules dites à « large spectre », moins sélectives, ciblant à la fois le transporteurs de la 5-HT, de la NA et/ou de la DA. Celles-ci représentent un raffinement des agents pharmacologiques précédents puisque leur affinité pour les transporteurs monoaminergiques est moins forte mais plus équilibrée entre les 3 composantes 5-HT, NA et DA (Guiard et al., 2009).

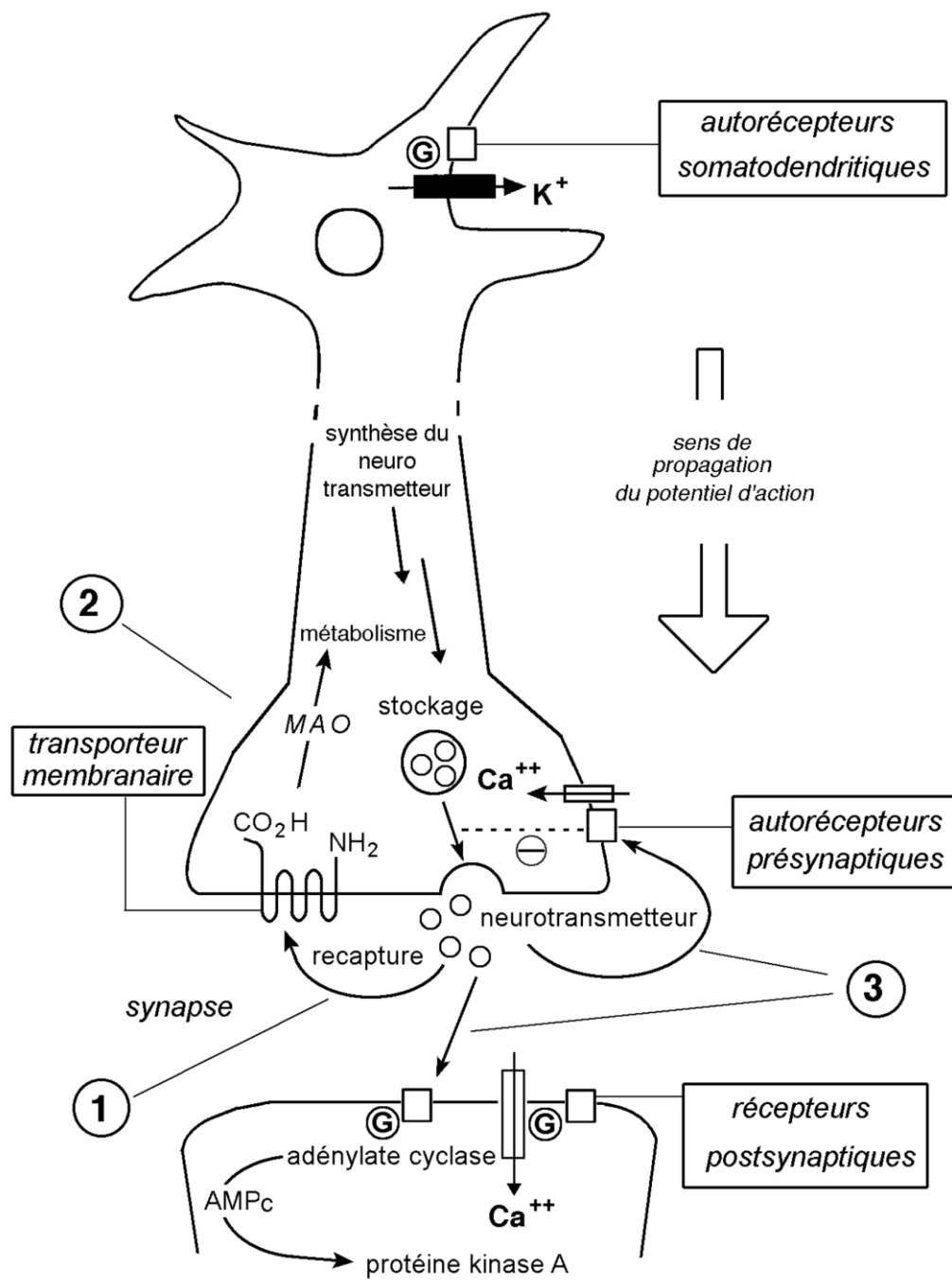


Figure 9 : Mécanismes d'action des antidépresseurs sur la neurotransmission synaptique (D'après Artigas et al., 2002).

3.3. Les Inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)

1) Administration unique

Les études de microdialyse intracérébrale et d'électrophysiologie menées chez le Rat ou la Souris montrent que l'administration d'une dose unique d'ISRS provoque une plus forte augmentation de 5-HT autour des corps cellulaires des noyaux du raphé que dans les régions cérébrales riches en terminaisons sérotoninergiques. Cette plus faible réponse dans les régions terminales a été associée à une inhibition de la décharge électrique des neurones sérotoninergiques dans le noyau du raphé dorsal (NRD) (**figure 10**). Ceci peut être dû à 2 phénomènes (non exclusifs) :

→ la présence d'une plus grande densité de transporteurs de la sérotonine SERT dans la région des noyaux du raphé en comparaison à celle des terminaisons sérotoninergiques comme cela a été observé dans les études de liaison de la [^3H]-paroxétine chez le Rat (Hrdina et al., 1990) et chez l'Homme (Cortes et al., 1988 ; Duncan et al., 1992).

→ la mise en route d'un rétrocontrôle négatif exercé par les autorécepteurs somatodendritiques de type 5-HT_{1A} et terminaux de type 5-HT_{1B} sur la libération de sérotonine suite à son accumulation extracellulaire consécutive au blocage du SERT par les ISRS.

Les tableaux 10 ; 11 et 12 récapitulent les effets neurochimiques et électrophysiologiques obtenus lors d'une administration aigue de différents ISRS.

Espèce	ISRS	Dose (voie d'administration)	Augmentation maximale des [5-HT] _{ext} (AUC)	Références
Rat	Citalopram	1,10 mg/kg i.p.	400%	Invernizzi et al., 1992
	Fluoxétine	1, 10, 20 mg/kg i.p.	300%	Malagie et al., 1995
		3 mg/kg i.p.	300%	Hervas and Artigas, 1998
		1, 10 mg/kg i.p.	400 à 600%	Bel and Artigas, 1992
	Paroxétine	1 mg/kg i.p.	300%	Malagie et al., 2000
	Fluvoxamine	30 mg/kg p.o.	300%	Bosker et al., 1995
Souris WT	Fluoxétine	5-20 mg/kg	150-250%	Bortolozzi et al., 2004
	Paroxétine	4 mg/kg i.p.	240%	Guilloux et al., 2006

Tableau 10 : Augmentation des [5-HT]_{ext} dans le noyau du raphé dorsal après administration aigue d'ISRS chez le Rongeur.

Espèce	ISRS	Dose (voie d'administration)	Augmentation maximale des [5-HT] _{ext} (AUC)	Références
Rat	Escitalopram	7.8 mg/kg i.p.	300%	Mork et al., 2003
	Citalopram	1,10 mg/kg i.p.	200%	Invernizzi et al., 1992
	Fluoxétine	1, 10, 20 mg/kg i.p.	<200%	Malagié et al., 1995 ; 1996
		3 mg/kg i.p.	150%	Hervas and Artigas, 1998
		10 mg/kg i.p.	200%	Bel and Artigas, 1992
	Paroxétine	1 mg/kg i.p.	300%	Malagié et al., 2000
Souris WT	Escitalopram	8 mg/kg i.p.	290%	Nguyen et al., 2011
	Citalopram	8 mg/kg i.p.	250%	David et al., 2003
	Fluoxétine	1, 5, 10 mg/kg i.p.	300%	Malagié et al., 2000
		1, 40 mg/kg p.o.	250%	Kobayashi et al., 2008
	Paroxétine	8 mg/kg i.p.	200%	David et al., 2003 ;
		4 mg/kg i.p.	180%	Guilloux et al., 2006
		1, 5 mg/kg i.p.	300%	Malagié et al., 2001

Tableau 11 : Augmentation des [5-HT]_{ext} dans le cortex frontal après administration aigue d'ISRS chez le Rongeur.

Espèce	ISRS	ED50	Inhibition de la décharge de 5-HT neuronale	Références
Rat	Escitalopram	58 µg/kg i.v.	100%	El Masari et al., 2005
	Citalopram	254 µg/kg i.v.	100%	
	Fluoxétine	5000 µg/kg i.v.	100%	Migueluez et al., 2009
	Paroxétine	240 µg/kg i.v.	100%	Di Mascio et al., 1998
	Sertraline	180 µg/kg i.v.	100%	
Souris WT	Fluoxétine	2-16 mg/kg i.v.	100%	Amargos-Bosh et al., 2004

Tableau 12 : Inhibition de la décharge électrique des neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal après administration aigue d'ISRS chez le Rongeur. ED₅₀ : Dose permettant d'obtenir 50% de l'effet maximal

2) Administration chronique

En microdialyse intracérébrale, après traitement chronique avec un ISRS une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} a été observée (Kobayashi et al., 2008 ; Rossi et al., 2008 ; Popa et al., 2010). Elle se traduit notamment par une absence d'effets d'un antagoniste sélectif, le WAY-100635 qui ne potentialise plus les effets d'une dose test ou challenge soit d'ISRS (Hervas et al., 2001; Dawson et al., 2002) soit d'un agoniste sélectif, le 8-OH-DPAT, ce dernier inhibant la libération de 5-HT dans différentes régions terminales sérotoninergiques (Invernizzi et al., 1994; Dawson et al., 2002; Newman et al., 2004). Bien que ce mécanisme soit aujourd'hui complètement admis, certains auteurs n'ont pas observé de désensibilisation des autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} chez le Rat (Arborelius et al., 1996 ; Hjorth and Auerbach, 1999). Il est possible que de tels résultats négatifs puissent s'expliquer par la dose ou la durée du traitement chronique utilisée, ou par des différences de conditions expérimentales (rat anesthésié ou éveillé lors du « challenge » ; canulé ou pas). Néanmoins, il semble clairement établi que la désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} constitue un mécanisme majeur dans la manifestation des effets thérapeutiques des ISRS suite à leur administration chronique. En accord avec cette hypothèse, une étude récente réalisée par le groupe du Pr Artigas montre que l'inactivation spécifique des autorécepteurs 5-HT_{1A} situés dans le NDR à l'aide de micro ARNs administrés par voie i.c.v. (intra-cerebro-ventriculaire), renforce les effets neurochimiques et comportementaux des ISRS chez la Souris (Bortolozzi et al., 2011). Cette stratégie innovante offre de nouvelles perspectives thérapeutiques dans le but de raccourcir, par exemple, le délai d'action des ISRS.

Par ailleurs, suite à un traitement chronique avec un ISRS, le couplage des autorécepteurs 5-HT_{1A} à leur protéine G – mesuré par la liaison du GTP- γ [S³⁵], est fortement atténué dans le NRD (Hensler, 2002 ; Shen et al., 2002). Ces résultats suggèrent une diminution de la capacité des récepteurs 5-HT_{1A} à activer leurs protéines G et confirment la désensibilisation fonctionnelle de ces récepteurs lors d'un traitement antidépresseur chronique.

Les études électrophysiologiques portant sur les effets d'un traitement chronique avec un ISRS montrent un retour progressif de l'activité électrique basale de neurones sérotoninergique dans le NRD au cours du traitement chez le Rat (Blier et de Montigny, 1994 ; Haddjeri et al., 1998 ; El Mansari et al., 2005) ou chez la Souris (Guiard et al., 2011 ; **voir figure 10**). Ce retour traduit une désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} (Blier et de Montigny, 1983; Chaput et al, 1986; Le Poul et al, 1995) en rapport avec l'importante augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans le NRD consécutive au blocage du SERT dans cette région par les ISRS (Bel et Artigas, 1992; Hjorth et al., 1995; Guilloux et al., 2006).

Les études se focalisant sur les effets d'un traitement chronique avec un ISRS sur l'activité des autorécepteurs terminaux 5-HT_{1B} ont abouti à des conclusions contradictoires. Si certaines d'entre elles relèvent des modifications de l'activité inhibitrice des autorécepteurs 5-HT_{1B} chez le Rat (El Mansari et Blier, 1996 ; Sayer et al., 1999; Newman et al., 2004), d'autres n'ont pas réussi à identifier de telles altérations fonctionnelles chez le Rat (Auerbach et Hjorth, 1995 ; Bosker et al., 1995; Cremers et al., 2000) ou chez la Souris (Gardier et al., 2003). Par exemple, les effets inhibiteurs ou excitateurs respectivement d'une dose challenge d'un agoniste ou d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1B} persistent chez des rats traités pendant 2 ou 3 semaines avec le citalopram ou la fluvoxamine (Bosker et al., 1995; Gundlach et al., 1997), suggérant ainsi une absence de désensibilisation de ces autorécepteurs terminaux. Il est probable que des différences de conditions expérimentales expliquent ces divergences.

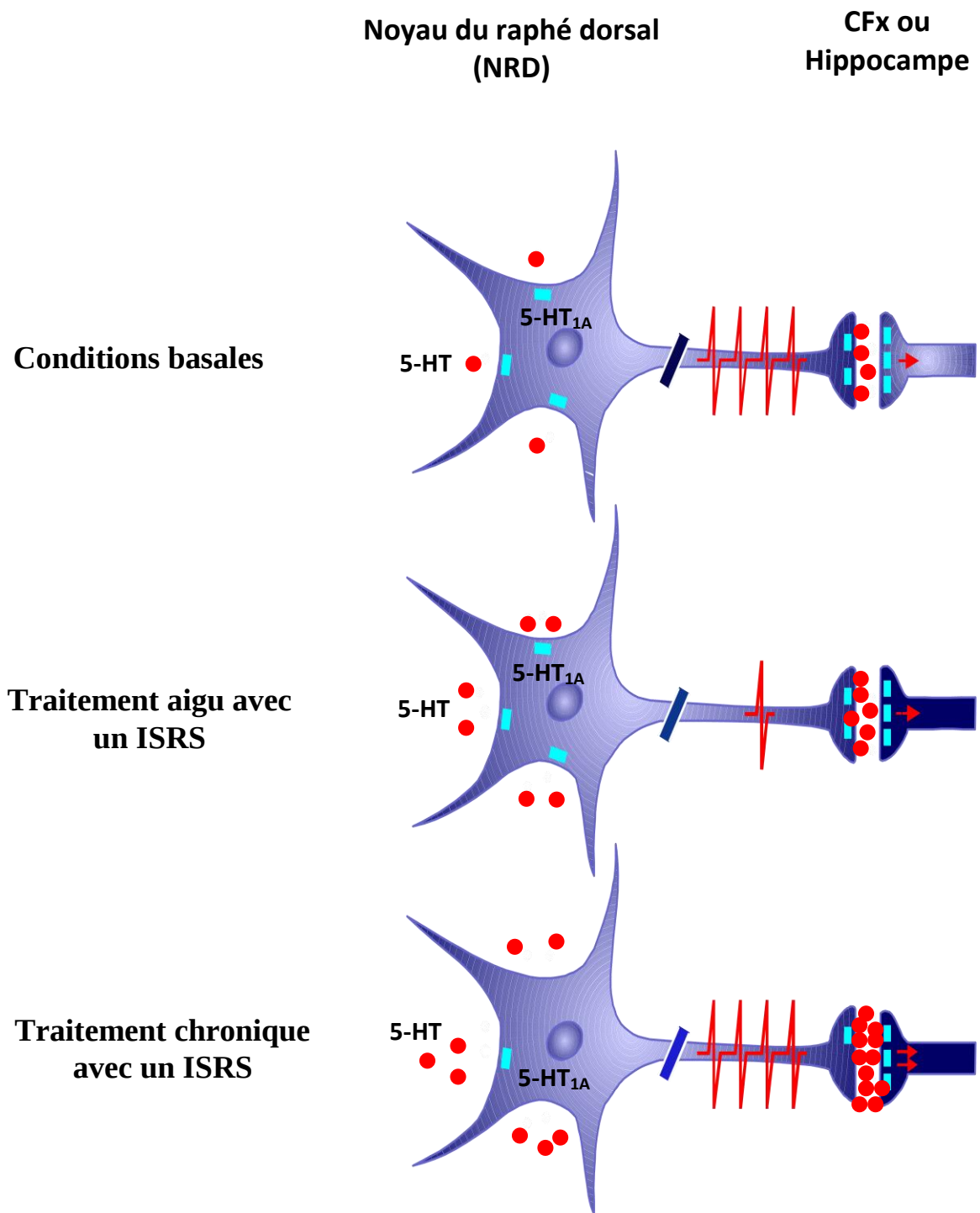


Figure 10 : Mécanisme d'action pré-synaptique des ISRS
(D'après Guiard et al., 2011)

3) L'exemple particulier du **Escitalopram**

Nom chimique : (S) - 1 - [3-(diméthylamino)propyl] - 1 - (4'-fluorophényl) - 1,3 - dihydroisobenzofuran - 5 - carbonitrile.

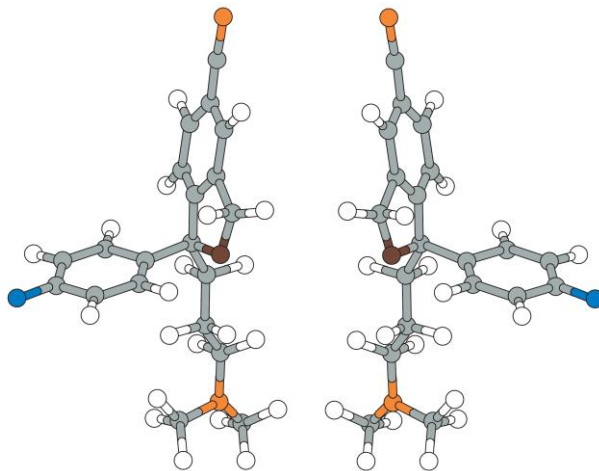


Figure 11 : Les énantiomères S et R du citalopram (D'après Sanchez et al., 2003).

a) Propriétés pharmacologiques pré-cliniques du escitalopram

Sélectivité sérotoninergique du escitalopram?

Le escitalopram (S-(+)-citalopram) est l'énantiomère actif du mélange racémique : le citalopram (**Figure 11**). Différentes études révèlent que le escitalopram entraîne une inhibition de la recapture de la 5-HT avec une grande sélectivité (Hyttel et al., 1992 ; Hyttel, 1994, Sánchez et al., 2004 ; Mnie-Filali et al., 2007). Par ce mécanisme, le escitalopram bloque la capture de la 5-HT avec une valeur d'IC₅₀ de 2,1 nM comparée à 280 nM pour le R-énantiomère et 3,9 nM pour le citalopram dans des synaptosomes du cerveau du rat *in vitro* (Montgomery et al., 2001). En présence de citalopram, le site d'action pharmacologique, ou site principal, responsable de l'inhibition du transporteur, est occupé par l'énantiomère S. Une hypothèse originale suggère que le R-citalopram se fixe quant à lui sur un site allostérique de SERT, ce qui a pour effet de limiter l'inhibition du transporteur alors de la fixation du escitalopram sur le site principal, et donc de limiter les effets du escitalopram quand on administre le mélange racémique. Cette limitation n'existe pas en présence de escitalopram seul (Sánchez et al., 2004 ; Zhong et al., 2011, **figure 12**).

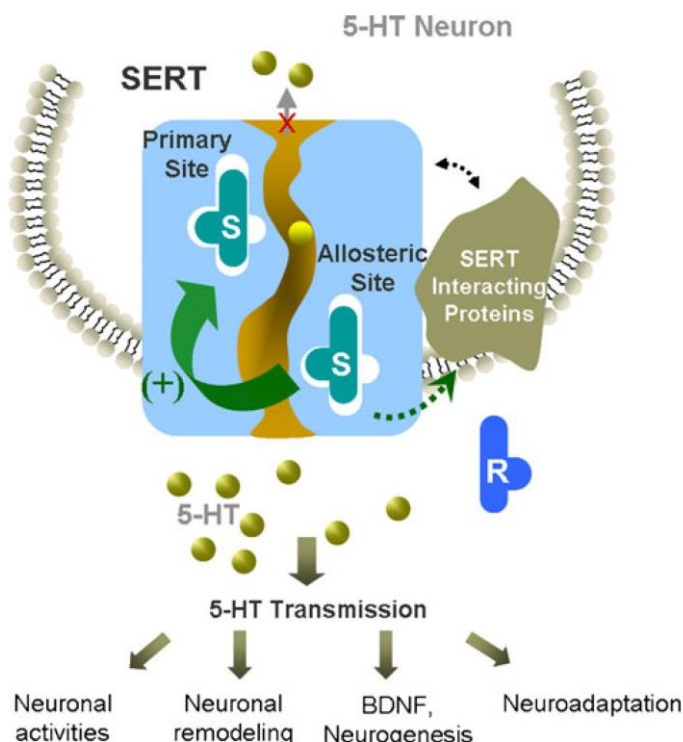


Figure 12 : Modélisation du transporteur SERT humain, protéine transmembranaire avec les deux sites de reconnaissance des IRSS (D'après Zhong et al., 2011).

Les études *in vitro* révèlent que le escitalopram présente une meilleure affinité que le citalopram vis à vis du SERT. En fait, Owens et al. (2001) ont étudié l'inhibition des transporteurs humains de la 5-HT, de la NA et de la DA par le escitalopram en utilisant des préparations de membranes de cellules exprimant de façon stable ces différents transporteurs. Les affinités de liaison (valeurs K_i , nM) des différents ISRS vis à vis du SERT, du NAT et du DAT ainsi que les ratios de sélectivité d'inhibition « NA/5-HT » et « DA/5-HT » sont présentés dans **la figure 13**. Le escitalopram se caractérise par une forte affinité pour le transporteur de la 5-HT et une faible affinité pour les transporteurs de la NA et de la DA, ainsi que par un ratio de sélectivité élevé d'inhibition de NA/5-HT et de DA/5-HT. Des études antérieures utilisant des synaptosomes de cerveau de rat ont démontré un ratio de sélectivité du même ordre de grandeur (Hyttel et al., 1992). Par ailleurs, le escitalopram (y compris son métabolite, déméthyl-escitalopram) n'a pas d'activité significative sur 140 récepteurs testés tels que GABAA, GABAB, 5-HT_{1A/1B} ; 5-HT_{2A/2B/2C} ; etc... (Sánchez et al., 2002).

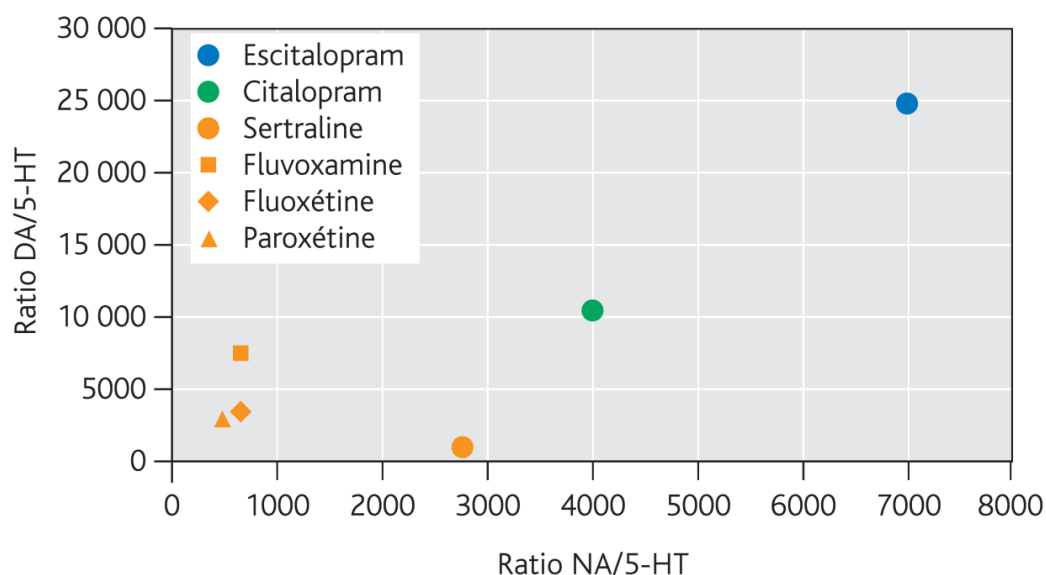


Figure 13 : Sélectivité des ISRS pour les sites de liaison des transporteurs de la 5-HT versus NA et DA. Données issues de préparations membranaires de cellules HEK-293 exprimant les transporteurs monoaminergiques humains (D'après Sánchez et al., 2002).

Les études de microdialyse *in vivo* chez des rats ont montré que par rapport au citalopram, le escitalopram entraînait une augmentation plus importante de la concentration extracellulaire de la 5-HT dans le cortex frontal (Mørk et al., 2003 ; Ceglia et al., 2004). Le R-citalopram n'a pas d'effet sur ces concentrations tandis qu'il module les propriétés inhibitrices du escitalopram sur la recapture de la 5-HT (Mørk et al. 2003 ; Mnie-Filali et al., 2007, Zhong et al., 2011).

Il est cependant intéressant de noter que différentes études de microdialyse révèlent que les ISRS dont **le citalopram**, sont également capables d'augmenter les concentrations extracellulaires de NA dans le cortex frontal ou le locus coeruleus (LC) chez la souris ou chez le rat (Millan et al., 2001 ; David et al., 2003 ; Ortega et al., 2010) (**Tableau 13**) suggérant que la **sélectivité des ces composés déterminée *in vitro* ne reflète pas forcément leurs propriétés pharmacologiques *in vivo***. Une partie de ce travail de thèse a eu pour objectif de vérifier si de tels effets neurochimiques sont également observés avec le escitalopram et de déterminer le mécanisme cellulaire pouvant expliquer une éventuelle perte de sélectivité *in vivo*.

IRSS	Espèce	Région	Traitement	Dose/voie d'administration	Augmentation maximale (AUC %) des			Méthode (microdialyse)	Référence
					[5-HT] _{ext}	[NA] _{ext}	[DA] _{ext}		
Escitalopram	Souris mâles	Cortex frontal	unique	4-8 mg/kg	↑ max 300%	↑ 150 %	↑103%	A:+1.6; L:1.3; V:-1.6. LCR : 1,5 µl /15 min	Nguyen et al., 2011
Citalopram	Rats Sprague-Dawley mâles	locus coeruleus	unique	10 mg/kg i.p.		↑ 150%		A:+3.2 ; L: 3.0; V: -4.0 LCR : 1 µl /20 min	Ortega et al., 2010
Citalopram	Rats Sprague-Dawley mâles	Cortex frontal	unique	2-8 mg/kg i.p.	↑ 140-380% (max: 4mg/kg)			A:+3.2 ; L: 3.0; V: -4.0 LCR : 1 µl /20 min	Mork et al., 2003
Escitalopram				1, 3.9, 7.8 mg/kg i.p.	↑ 200-450% (max: 3,9mg/kg)				
Citalopram	Souris Swiss mâles	Cortex frontal	unique	1, 4, 8 mg/kg i.p.	↑ max: 240%	↑ 140%		A:+2.0; L:1.2; V:-1.6. LCR : 1,5 µl /15 min	David et al., 2003
Citalopram	Rats mâles	Cortex préfrontal	unique	5 mg/kg i.p.	↑ max: 480%	⇔ 102%	⇔ 104%	A:+2.6; L:+1.2 ; V :-3.6 LCR : 1 µl /20 min	Weikop et al., 2007
Citalopram	Rats mâles	Cortex frontal	unique	10-40 mg/kg s.c.	↑ max: 380%	↑ 200 %	↑150%	A: 2.2; L: 0.6; V:-4.0 LCR: 1,0 µl /20 min	Millan et al., 2001
Fluoxétine	Rats mâles	Cortex préfrontal	unique	8 mg/kg	↑ max 300%	↑ 140 %	↑200%	A:+2.6; L:+1.2 ; V :-3.6 LCR : 1 µl /20 min	Jordan et al., 1994
Fluoxétine	Rats mâles	Cortex préfrontal	Perfusion locale	5 µM		↑ 180 %		A: 3.5; L: 1.5; V:-5.0 LCR: 1,0 µl /20 min	Hughes and Stanford, 1996; 1998
Fluvoxamine	Rats mâles	Cortex frontal	unique	12 mg/kg i.p.		↑ 140%		A: 3.2; L: 1.2; V:-6.0 LCR: 2,0 µl /20 min	Shachar et al., 1997
Fluoxétine	Rats mâles	Cortex frontal	unique	10-20 mg/kg i.p.	↑ max : 350%	↑ 250 %	↑300%	A: 3.2; L: 0.8; V:-5.0 LCR: 1,0 µl /20 min	Koch et al., 2002
Paroxétine	Souris Swiss mâles	Cortex frontal	unique	1, 4, 8 mg/kg i.p.	↑ max <200%	↑150 %		A:+2.0; L:1.2; V:-1.6. LCR : 1,5 µl /15 min	David et al., 2003

Tableau 13 : Effets de l'administration d'ISRS sur les trois monoamines déterminés par la technique de microdialyse intracérébrale *in vivo* chez les Rongeurs éveillés. (Les cases grisées représentent les études non réalisées à ce jour).

Des études électrophysiologiques *in vivo* du escitalopram

Les études d'électrophysiologie menées chez le Rat ou la Souris montrent que l'administration d'une dose unique de escitalopram provoque une forte diminution de la décharge électrique des neurones sérotoninergiques dans le NRD (El Mansari et al., 2005 ; Guiard et al., 2011). Cette diminution peut être expliquée par une plus grande activation des autorécepteurs 5-HT_{1A} (Blier et de Montigny, 1983; Blier et al., 1984; Chaput et al., 1986; Le Poul et al., 1995) en raison de l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans le NRD (Bel et Artigas, 1992; Hjorth et al, 1995; Romero et al, 1996). Un retour à une fréquence basale normale a été observé lorsque le traitement se prolonge avec un délai d'action plus court que celui observé avec les autres ISRS (Chaput et al, 1986; Blier et de Montigny, 1994 ; El Mansari et al., 2005 ; Guiard et al., 2011) (**Tableau 14**). Les effets chroniques du escitalopram se traduisent par une augmentation de l'activation tonique des récepteurs 5-HT_{1A} post-synaptiques situés notamment dans l'hippocampe ventral (El Mansari et al., 2005 ; Guiard et al., 2011) et dont le rôle dans le comportement antidépresseur/anxiolytique a été fortement suggéré chez la souris (Santarelli et al., 2003).

ISRS	Espèce	Dose	Inhibition de la décharge de 5-HT neuronale du escitalopram et du citalopram					Références
			0 jour	2 jours	7 jours	14 jours	21 jours	
Escitalopram	Souris	10 mg/kg s.c.	72%	70%	50%	40%	10%	Guiard et al., 2011
Escitalopram	Rat	10 mg/kg s.c.	100%		61%	11%	↔	El Mansari et al., 2005
Citalopram	Rat	20 mg/kg s.c.	100%		70%	58%	↔	
Escitalopram	Rat	10 mg/kg s.c.			70%	↔		Ghanbari et al., 2010
Escitalopram	Rat	10 mg/kg s.c.				↔		Chernoloz et al., 2009
Citalopram	Rat	20 mg/kg i.p.		70%	40%	↔		Chaput et al., 1986

Tableau 14 : Inhibition de la décharge électrique des neurones 5-HT du NRD après administration chronique de citalopram ou escitalopram chez le rat ou la souris.

↔ : un retour à l'activité normale de la décharge neuronale sérotoninergique

Modèles animaux de dépression et d'anxiété du escitalopram

Le escitalopram s'est révélé efficace dans une série de tests prédictifs de l'activité antidépressive d'une molécule. Dans le test de la nage forcée chez la Souris ou le Rat, le escitalopram s'est révélé plus efficace que d'autres ISRS, tandis que le R-énantiomère est resté inactif (Reed et al., 2008 ; Bourin et al., 2009). Dans un modèle de dépression, dans lequel des rats ont été exposés à un stress chronique léger, le escitalopram a également montré une activité de type antidépressive avec une rapidité d'action plus marquée que les autres ISRS (Hasson et al., 2011).

b) Propriétés pharmacologiques cliniques du escitalopram

Pharmacodynamique :

Inhibition de la recapture

Chez l'homme, l'effet inhibiteur de le escitalopram sur la recapture de la 5-HT est bien établie (Sánchez et al., 2004). Ceci a été démontrée en utilisant des mesures de tomographie à émission de photon (TEP) au niveau de sites de capture de la sérotonine, notamment chez des volontaires sains qui présentent un blocage significatif des sites de recapture à des doses cliniquement actives du citalopram racémique (Pirker et al., 1995).

Pharmacocinétique chez l'Homme:

Escitalopram versus citalopram

La dose de escitalopram administrée sous forme de comprimés de 20 mg est virtuellement identique à celle du citalopram à 40 mg. Comme dans les études menées chez l'animal, il n'y a aucune différence chez l'Homme dans la pharmacocinétique du escitalopram comparé au citalopram. Il n'y a pas non plus d'indication d'une conversion du S-énantiomère en R-énantiomère *in vivo* après administration de S-énantiomère. Ainsi, l'organisme est exposé aux mêmes concentrations de escitalopram, qu'il soit administré sous forme d'énantiomère simple ou du mélange racémique.

Absorption et biodisponibilité

Le escitalopram est rapidement absorbé au niveau intestinal, avec des concentrations plasmatiques maximales obtenues environ 3 à 4 heures après son administration orale (Van Gorp et al., 2001). Le profil pharmacocinétique du escitalopram est linéaire. Conformément aux attentes, la biodisponibilité absolue du escitalopram correspond à celle du citalopram (environ 80%), avec un effet de premier passage intestinal et hépatique limité (Joffe et al., 1998). L'absorption du escitalopram n'est pas influencée par la prise alimentaire.

Distribution

Le volume de distribution du escitalopram est de 12-26 l/kg, ce qui suggère une distribution tissulaire extensive. La liaison du escitalopram et de ses principaux métabolites aux protéines plasmatiques est de 50 - 80% (Joffe et al., 1998).

Métabolisme

Le escitalopram est métabolisé par le cytochrome P450 (CYP) en déméthylescitalopram et ensuite en un métabolite didéméthylé à peine décelable. En se fondant sur les résultats obtenus avec le citalopram, le dérivé d'acide propionique est un autre métabolite pharmacologiquement inactif, susceptible d'être formé par des monoamines oxydases. De plus, un métabolite N-oxyde et des glucuronides ont été identifiés (Joffe et al., 1998). Ils sont tous inactifs sur le plan thérapeutique. Le métabolisme du escitalopram en déméthylescitalopram passe par trois isoenzymes CYP: CYP2C19, CYP2D6 et CYP3A4, mais seul le CYP2D6 entraîne une déméthylation supplémentaire (Von Moltke et al., 2001). Ces données indiquent que les variations génétiques du CYP2D6 ou CYP2C19, qui peuvent être l'expression d'un polymorphisme génétique, n'ont vraisemblablement pas d'effet majeur sur la pharmacocinétique du escitalopram (Von Moltke et al., 2001).

Élimination, clairance et demi-vie

L'excrétion rénale représente la principale voie d'élimination du escitalopram et de ses métabolites, compte tenu d'un faible pourcentage d'élimination par le transit colique (Van Gorp et al., 2001). La demi-vie d'élimination du escitalopram est d'environ 30 heures chez l'Homme

(Van Gorp et al., 2001) et la clairance plasmatique après administration orale est d'environ 0,6 l/min. Dans la fourchette de doses étudiée, la pharmacocinétique est linéaire.

Efficacité clinique dans la dépression

Le escitalopram a été développé comme successeur du citalopram. Grâce à sa forte sélectivité, son activité thérapeutique est supposée supérieure à celle des autres ISRS. Alors que des travaux récents associaient la double action des antidépresseurs sur les systèmes sérotoninergique et noradrénergique du SNC à une meilleure efficacité (Van Gorp et al., 2001), les études de Gorman et collaborateurs (2002), ont montré que le escitalopram présentait une meilleure efficacité et une amélioration plus rapide des symptômes dépressifs que le citalopram, tout en ayant une tolérance aussi bonne (Gorman et al., 2002). L'efficacité clinique du escitalopram a essentiellement été étudiée dans le traitement de maladies dépressives. L'efficacité clinique de l'administration quotidienne de 10 mg de escitalopram a été clairement démontrée tant chez les spécialistes (psychiatres) qu'en soins primaires (Burke et al., 2002).

Efficacité clinique dans les troubles anxieux

L'efficacité des ISRS dans le traitement de divers troubles anxieux, dont les troubles paniques, les troubles anxieux généralisés, les troubles obsessionnels compulsifs et les phobies sociales (Isaac, 1999) est bien documentée. Les ISRS sont par conséquent de plus en plus prescrits comme traitement de premier choix des troubles anxieux (Joubert et Stein, 1999). Les résultats du programme de développement clinique du escitalopram utilisé dans le traitement des dépressions montrent également des résultats très prometteurs pour le traitement des troubles anxieux. En effet, en comparaison au placebo, les symptômes anxieux ont été significativement améliorés (critère secondaire de l'efficacité) par la prise de escitalopram pendant 6 semaines (Gorman et al., 2002). Concernant le citalopram, la bonne tolérance et l'efficacité du produit sur le contrôle des symptômes de l'anxiété ont pu être démontrées pour une série de troubles chez des patients différents (Joubert et Stein, 1999). Une méta-analyse réalisée à partir d'études en double aveugle auprès d'environ 2000 patients, a mis en évidence une amélioration significative des symptômes anxieux concomitants chez les patients dépressifs traités par citalopram (Joubert et Stein, 1999).

3.4. Stratégies d'augmentation des effets en clinique

Malgré les avancées réalisées dans le développement des antidépresseurs, il reste encore de nombreux points non résolus pour améliorer les traitements actuels (**tableau 15**). Les plus handicapants sont le long délai d'action et le nombre de patients résistants (environ 30% ne répondent pas au premier traitement). Dans cette partie, nous aborderons les principales stratégies de potentialisation utilisées en clinique afin de pallier à l'une ou l'autre de ces limites des antidépresseurs, notamment des ISRS.

Priorité	Amélioration clinique nécessaire pour le développement de nouvelles thérapeutiques
+++	(↓) Diminution du délai d'action
+++	(↑) Meilleure efficacité chez les patients résistants
++	(↓) Diminution des effets indésirables (dysfonction sexuelle, nausées précoces)
+	Prise de Poids
+	Régulation du cycle veille/sommeil

Tableau 15 : Améliorations cliniques nécessaires pour le développement de nouvelles thérapeutiques

1) ISRS et antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (Pindolol)

En raison de rétrocontrôle négatif exercé par les autorécepteurs 5-HT_{1A} sur l'activité du système sérotoninergique central, ces derniers constituent une cible privilégiée dans le cadre de stratégies de potentialisation. En 1993, l'équipe du Pr Francesc Artigas (CSIC, Madrid, Espagne) a été la première à proposer, suite à des études chez l'animal, que les antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (i.e. sélectif, le WAY 100635) et le (±)Pindolol, un antagoniste non sélectif des récepteurs 5-HT_{1A} puisqu'il est aussi antagoniste des récepteurs $\beta_1\beta_2$ -adrénergiques, pourraient potentialiser les effets des ISRS chez l'Homme en prévenant ce rétrocontrôle négatif (Artigas et al., 1994 ; Pérez et al., 1997). Deux études cliniques ouvertes comparant les effets d'une co-administration d'un ISRS (paroxétine) et d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (pindolol) *versus* un ISRS (paroxétine) seul, ont été réalisées chez des patients déprimés afin d'observer les

effets éventuellement bénéfiques de l'association (Artigas et al., 1994 ; Blier et Bergeron, 1995 ; Artigas et al., 1996). Une de ces études fut très encourageante, car plus de 50% des patients non traités et des patients résistants au traitement présentait une rémission de leur état dépressif. Il faut noter que dans une étude publiée par les Professeurs Blier et Bergeron (1995), une amélioration du score HDRS de plus de 50% chez 17 des 28 patients traités a également été observée. En revanche, le pindolol ne potentialise pas l'action des antidépresseurs non sérotoninergiques comme la désipramine (Blier et al., 1997).

La majorité des études ont comparé les effets d'une co-administration (ISRS/Pindolol) *versus* (ISRS/Placebo). Sur le critère du délai d'action des ISRS, 13 études sur 16 ont montré à ce jour, que le pindolol diminue le délai d'action des ISRS, légitimant ainsi la co-prescription d'un tel traitement en première intention chez le patient déprimé. Ces résultats ont été confirmés par les méta-analyses de Ballesteros et Callado (2004) et Portella et al. (2011) qui indiquent que cette bithérapie est efficace, principalement lors des 2 premières semaines de traitement (**Tableau 16**). Ce sont des résultats tout à fait intéressants, sachant qu'actuellement, 50% des essais cliniques contrôlés n'arrivent pas à séparer l'activité antidépressive d'une molécule comparée à celle d'un placebo. Sur le critère « efficacité de la co-administration », 15 études sur 18 ont montré un bénéfice de cette co-administration.

Quelques études cliniques menées par le groupe d'Artigas ont permis de préciser les conditions permettant d'observer un bénéfice de l'association (ISRS/pindolol). On note ainsi que :

- l'étude « en double aveugle » de Zanardi et al. (1997) portant sur 63 patients non traités au préalable avec un antidépresseur a montré une accélération des bénéfices de la paroxétine (réduction du score sur l'échelle d'Hamilton) lorsqu'on l'associe au pindolol pendant toute la durée du traitement (4 semaines) et que l'on compare à un groupe traité avec de la paroxétine seule, ou bien à un groupe traité avec paroxétine (4 semaines) et pindolol (1 semaine seulement). Un autre β -bloquant, le métoprolol n'apporte pas de bénéfices car il n'a pas de propriété antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}. La sélectivité d'action du pindolol vis-à-vis du récepteur 5-HT_{1A}, est possible grâce à la faible dose administrée dans ces études, soit 7,5 mg/jour. En effet, une étude d'autoradiographie réalisée chez quatre espèces différentes (rat, cobaye, singe et homme) a montré que le (-)-pindolol déplace le [³H]-WAY 100635 de sa liaison au récepteur 5-HT_{1A}, à 10⁻⁶M dans toutes les régions cérébrales étudiées (Raurich et al., 1999). De plus, l'affinité du (-)-pindolol pour le récepteur 5-HT_{1A} humain est inférieure à sa concentration

plasmatique mesurée chez des patients déprimés traités avec l'association (fluoxétine/pindolol). Il semble cependant que le (-)pindolol puisse déplacer des ligands du récepteur 5-HT_{1A} aussi bien dans les noyaux du raphé (autorécepteurs) que dans l'hippocampe (récepteurs post synaptiques).

- L'étude de Perez et al., 1997 dans le *Lancet* montre qu'un plus grand nombre de patients déprimés répondent à un traitement associant (fluoxétine/pindolol) plutôt qu'à l'association (fluoxétine/placebo). De plus, le nombre de jour pour atteindre cette réponse positive à la co-administration (fluoxétine/pindolol) est plus faible. L'efficacité de l'un ISRS semble donc être améliorée par son association avec le pindolol.

- L'étude « en double aveugle » de Zanardi et al. (2001a) qui portait sur 155 patients a observé que le pindolol potentialise l'action de la fluvoxamine spécifiquement chez les patients homozygotes présentant la forme « s » du transporteur de la sérotonine. Par contre, chez les patients présentant un polymorphisme C(-1019)G du récepteur 5-HT_{1A}, la réponse antidépressive observée après la co-administration de paroxétine et de pindolol n'est pas améliorée (Lemondet et al., 2004).

ISRS	Type de patients (Nombre de patients)	Objectifs de l'étude	Durée de l'étude	Dose de pindolol	Délai d'action	Efficacité	Référence
Paroxétine	Sans traitement N=63	↓ délai d'action	4 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol>Placebo	Pindolol>Placebo	Artigas et al., 1994 ; Zanardi et al., 1997
	Sans traitement N=80	↓ délai d'action	6 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol≥Placebo	Pindolol=Placebo	Tome et al., 1997
	Sans traitement N=80	↓ délai d'action ↑ Efficacité	6 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol≥Placebo	Pindolol≥Placebo	Blier et Bergeron, 1995 ; Tome et al., 1997
	Patients résistants N=9	↑ Efficacité	4 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol=Placebo	Pindolol>Placebo	Sokolski et al., 2004
Fluoxétine	Sans traitement N=111	↓ délai d'action ↑ Efficacité	4 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol>Placebo	Pindolol>Placebo	Geretsegger et al., 2008 ; Portella et al., 2011
	Patients résistants N=8						
	Patients résistants N=31	↓ délai d'action ↑ Efficacité	5 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol=Placebo	Pindolol>Placebo	Maes et al., 1999
	Sans traitement N=27	↓ délai d'action ↑ Efficacité	6 semaines	7,5-10mg/jour	Pindolol=Placebo	Pindolol=Placebo	Berman et al., 1997 ; 1999
Fluvoxamine	Sans traitement N=10	↓ délai d'action ↑ Efficacité	4 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol>Placebo	Pindolol>Placebo	Blier et al., 1997 ; Zanardi et al., 1998 ; 2001a
Citalopram	Patients nonrésistants N=78	↓ délai d'action ↑ Efficacité	4 semaines	7,5 mg/jour	Pindolol>Placebo	Pindolol>Placebo	Plenge et Mellerup, 2003 ; Portella et al., 2011
Antidépresseur libre	Patients résistants N=31	↑ Efficacité	3 semaines	7,5 mg/jour		Pindolol=Placebo	Moreno et al., 1997 ; Perry et al., 2004

Tableau 16 : Récapitulatif des essais cliniques évaluant les effets de la co-administration ISRS / pindolol versus ISRS seul

Les premières études précliniques portant sur les effets de la co-administration ISRS/pindolol se sont intéressées à l'aspect neurochimique. Ainsi, différents travaux de microdialyse intracérébrale ont eu pour but de montrer la capacité du pindolol à potentialiser les effets des ISRS sur les concentrations extracellulaires de 5-HT ([5-HT]_{ext}) dans des régions cérébrales riches en terminaisons neuronales sérotoninergiques. Des travaux antérieurs du laboratoire ont permis de montrer que le Pindolol administré seul n'a pas d'effets sur les [5-HT]_{ext} dans le cortex frontal chez la Souris (Guilloux et al., 2006). Néanmoins, l'augmentation des [5-HT]_{ext} induite par la paroxétine est potentialisée par le pindolol dans le cortex frontal (CFx), mais également, et plus fortement, dans le noyau du raphé dorsal (NRD) (**tableau 17**).

La majorité des études électrophysiologiques portant sur les effets d'une co-administration de ISRS/pindolol sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques centraux montre chez le rat anesthésié que le pindolol bloque l'inhibition de l'activité électrique des neurones du NRD induite par l'ISRS (**Tableau 18**). A notre connaissance, seules les études de Sprouse et al. (2000) et de Rasmussen et al. (2004) n'ont pas révélé un tel effet, notamment avec la fluoxétine.

Les études comportementales ayant mesuré les effets de la co-administration d'un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} avec un ISRS ont principalement utilisé le test de la nage forcée (Forced Swimming Test ou FST) pour apprécier le bénéfice de l'association ISRS/pindolol sur l'activité de type antidépressive de l'ISRS (**Tableau 19**). La plupart de ces études montrent une absence d'effets du pindolol ou du WAY -100635 administré seul (Bourin et al., 1998 ; Einat et al., 2001 ; Guilloux et al., 2006) tandis que la co-administration ISRS/antagoniste du récepteur 5-HT_{1A} ne renforce pas l'effet de l'ISRS seul. Ceci suggère un rôle majeur du récepteur 5-HT_{1A} post-synaptique (plutôt que du récepteur 5-HT_{1A} pré-synaptique) dans la manifestations des effets thérapeutiques des ISRS chez l'animal (Guilloux et al., 2006). Les souris KO pour le récepteur 5-HT_{1A} ont de ce point de vue apporté des renseignements précieux.

ISRS	Région	Dose ; voie d'administration	Antagoniste 5-HT _{1A}	Dose ; voie d'administration	Potentialisation	Référence
Paroxétine	NRD	4 mg/kg I.P.	(±)Pindolol	100 µM intra-raphé	↗ 150%	Guilloux et al., 2006 *
	Hip	4 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	10 mg/kg s.c.	↗ 150%	
	CFx	0,8 mg/kg i.v.	(±)Pindolol	4 mg/kg s.c.	Pas d'effets	Gartside et al., 1999 **
		4 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	10 mg/kg s.c.	↗ 160%	Guilloux et al., 2006 *
		4 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	100 µM intra-raphé	↗ 160%	Guilloux et al., 2006 *
Fluoxétine	CFx	10 mg/kg s.c.	(-)Pindolol	10 mg/kg s.c.	↗ 200%	Gobert et Millan, 1999 **
		20 mg/kg s.c.	(±)Pindolol	10 et 15 mg/kg s.c.	↗ 200%	Dawson and Nguyen, 2000 **
	Hypothalamus	10 mg/kg i.p.	(-)Pindolol	1,3 et 5 mg/kg s.c.	↗ 180%	Dreshfield et al., 1996 **
Fluvoxamine	CFx	60 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	8 mg/kg i.p.	↗	Nakada, 2000 **
	Hip					
	NRD					
Citalopram	Hip	5 mg/kg s.c.	(-)Pindolol	8 mg/kg s.c.	↗ 200%	Hjorth, 1996 **
	Striatum	1 mg/kg i.p.		15 mg/kg i.p.	↗ 300%	Romero et al., 1996 **

Tableau 17 : Potentialisation des effets des ISRS par le pindolol : principales études neurochimiques

* études chez la Souris ; ** études chez le Rat

ISRS	Région	Dose ; voie d'administration	Antagoniste 5-HT _{1A}	Dose ; voie d'administration	Effets sur la décharge des neurones	Référence
Paroxétine	NRD	0,2 mg/kg i.v.	(-)Tertatolol	0,8 mg/kg i.v.	Reverse inhibition induite par la paroxétine	Gartside et al., 1999 *
		0,5 mg/kg i.v.	WAY-100635	0,1 mg/kg i.v.	Reverse inhibition induite par la paroxétine	Bermack et al., 2004 *
		10 mg/kg/jour pendant 2 jours	(-)Pindolol	15 mg/kg/jour pendant 2 jours	Reverse inhibition induite par la paroxétine	Romeron et al., 1996 *
Fluoxétine	NRD	10 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	5-20 mg/kg i.v.	Pas d'effet sur l'inhibition induite par la fluoxétine	Sprouse et al., 2000 *
		1 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	0,3-3 mg/kg i.v.	Pas d'effet sur l'inhibition induite par la fluoxétine	Rasmussen et al., 2004 *
		5 mg/kg i.p.	WAY-100635	0,1 mg/kg i.v.	Reverse inhibition induite par la fluoxétine	Fornal et al., 1999 ** (#)
Citalopram	NRD	0,3 mg/kg i.v.	(-)Pindolol	3 mg/kg i.v.	Reverse inhibition induite par le citalopram	Arborelius et al., 2000 *

Tableau 18 : Effets des antagonistes des récepteurs 5-HT_{1A} en co-administration avec des ISRS sur l'activité électrique des neurones sérotoninergique chez le Rat anesthésié.

** études in vivo chez le Rat anesthésié ; ** études in vivo chez l'animal éveillé chez le Rat (sauf # chez le Chat)*

ISRS	Dose ; voie d'administration	Antagoniste 5-HT _{1A}	Dose ; voie d'administration	Effets	Référence
Paroxétine	20 mg/kg i.p.	WAY-100635	0,1 et 1 mg/kg s.c.	Prx+Way=Prx	Tatarczyńska et al., 2002 *
	4 mg/kg i.p.		1 mg/kg s.c.		Guilloux et al., 2006 **
	20 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	4 et 8 mg/kg s.c.	Prx+Pin=Prx	Tatarczyńska et al., 2002 *
	4 mg/kg i.p.		10 mg/kg s.c.	Pin bloque effets Prx	Guilloux et al., 2006 **
Fluoxétine	30 mg/kg i.p.	WAY-100635	1 mg/kg i.p.	Way bloque effets Flx	De Vry et al., 2004 *
	10 et 40 mg/kg i.p.		0,1 mg/kg s.c.	Way bloque effets Flx	Moser et Sanger, 1999 *
Fluvoxamine	8 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	32 mg/kg i.p.	Flvx + Pin > Flvx	Redrobe et al., 1996 **
Citalopram	20 mg/kg i.p.	WAY-100635	0,1 et 1 mg/kg i.p.	Cit+Way=Cit	Tatarczyńska et al., 2002 *
	16 mg/kg i.p.	(±)Pindolol	32 mg/kg i.p.	Cit + Pin > Cit	Redrobe et al., 1996 **

Tableau 19 : Potentialisation des effets des ISRS par le pindolol : rappel des études comportementales dans le test de la nage forcée.

*** études chez le Rat, le Rat bulbectomisé ; ** études chez la Souris.*

2) ISRS et antipsychotiques

Les antipsychotiques de 1^{ère} génération, tels que l'halopéridol et la chlorpromazine, ont une longue histoire dans le traitement de la dépression. Bien que tous les médicaments antipsychotiques actuellement disponibles antagonisent les récepteurs dopaminergiques de type D₂, les antipsychotiques atypiques de 2^{ème} génération varient considérablement dans leur profil pharmacologique (**tableau 20**). Ces variations pourraient avoir d'importantes conséquences cliniques, y compris des effets qui iraient au delà du traitement de l'humeur. Par exemple, différentes études soulignent l'intérêt des antipsychotiques dans l'amélioration de certains troubles cognitifs. C'est le cas des antipsychotiques de seconde génération qui présentent la capacité d'antagoniser les récepteurs 5-HT_{2A}.

Antipsychotique	Affinité de liaison pour les récepteurs monoaminergiques (<i>in vitro</i>)									Références
	D ₁	D ₂	D ₄	α ₁	α ₂	5-HT _{1A}	5-HT _{2A}	5-HT _{2C}	5-HT ₃	
Haloperidol	25	1	25	46	360	7879	78	3085	>1000	Frankenburg et al., 1999; Keefe et al., 1999
Risperidone	75	3	7	2	3	490	0.6	26	>1000	Keefe et al., 1999 ;
Aripiprazole	No	0.34	44	57	57	1.7	3.4	15	No	Burstein et al., 2005 ; Vangveravong et al., 2011
Olanzapine	31	11	27	19	230	>1000	4	11	57	Keefe et al., 1999 ;
Quetiapine	455	160	No	7	87	2450	220	615	170	Keefe et al., 1999

Tableau 20 : Constantes d'affinité (K_i, nM) des principaux antipsychotiques typiques et atypiques

L'utilisation des antipsychotiques typiques de 1^{ère} génération a diminué en raison de leur association avec un risque accru de développer des symptômes extrapyramidaux (dystonie, akathisie, dyskinésie tardive) lié au blocage des récepteurs D₂ dans le striatum (Nelson et al., 2009), ainsi que le risque d'apparition de torsades de pointes à l'origine de morts subites (Ray et al., 2009). De plus en plus, les stratégies d'augmentation se développent en utilisant les antipsychotiques atypiques, dont l'affinité pour les récepteurs D₂ diminue au profit d'une affinité élevée pour les récepteurs sérotoninergiques de type 5-HT_{2A}. Pour une action efficace des antipsychotiques, il a été rapporté que l'occupation des récepteurs D₂ devait atteindre environ 65%. Toutefois, l'apparition des effets indésirables décrits ci-dessus apparaît pour une occupation des récepteur D₂ de l'ordre de 80% (Seeman et al., 2002).

Des études cliniques récentes indiquent que l'ajout d'un antipsychotique atypique à un ISRS permet d'augmenter le taux de réponse de ce dernier (Ostroff et Nelson, 1999 ; Shelton et Stahl, 2004 ; Thase et al., 2007 ; Garakani et al., 2008 ; Keitner et al., 2009). De plus, l'amélioration des troubles dépressifs avec cette association est obtenue souvent plus rapidement qu'avec l'ISRS seul (Celada et al., 2004 ; Tremblay et Blier, 2006 ; Bloch et al., 2006 ; Silver et al., 2011) (**Tableau 21**). L'association la mieux étudiée est fluoxétine/olanzapine qui a récemment obtenu une autorisation de mise sur le marché aux USA dans le traitement des épisodes dépressifs majeurs ainsi que dans les troubles bipolaires de type I.

Des études précliniques portant sur les effets de la coadministration ISRS/antipsychotique atypique ont porté sur l'aspect neurochimique, électrophysiologique et comportemental. Ainsi, différents travaux de microdialyse intracérébrale ont permis de montrer la capacité d'un antipsychotique atypique (e.g. risperidone, aripiprazle, olanzapine, quetiapine) à potentialiser les effets des ISRS sur les concentrations extracellulaires de 5-HT, de NA et de DA dans différentes régions cérébrales chez le Rat (Zhang et al., 2000; Bosch et al., 2005 ; Huang et al., 2006 ; Adachi et al., 2008) (**Tableau 21**). La majorité des études électrophysiologiques chez le rat anesthésié montre qu'un antipsychotique atypique prévient la diminution de l'activité électrique des neurones 5-HT du NRD, NA du LC ou DA de l'ATV induite par l'administration aiguë d'ISRS (Seager et al., 2005 ; Dremencov et al., 2007 ; Chernoloz et al., 2009) (**Tableau 21**). Toutefois, à notre connaissance, peu ou pas d'étude se sont intéressées aux effets des antipsychotiques sur l'activité électrique des neurones monoaminergiques après traitement chronique par les ISRS. En ce qui concerne le système sérotoninergique par exemple, il est possible qu'en cumulant le processus de désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} au blocage des récepteurs 5-HT_{2A}, l'activité électrique des neurones 5-HT soit augmentée de manière significative alors qu'elle revient uniquement au niveau basal en présence de l'ISRS seul. De plus, les études comportementales ayant mesuré les effets de la co-administration d'un antipsychotique atypique avec un ISRS ont principalement utilisé le test de la nage forcée (Forced Swimming Test ou FST) pour apprécier le bénéfice de l'association ISRS/antipsychotique sur l'activité de type antidépressive de l'ISRS. La plupart de ces études montrent que la coadministration ISRS/antipsychotique renforce les réponses comportementales de l'ISRS seul (Bourin et al., 2009 ; Dhir et Kulkarni, 2008 ; Rogoz, 2010) (**Tableau 21**). Ces données précliniques, en accord avec les observations cliniques, suggèrent donc un rôle majeur des récepteurs 5-HT_{2A} et/ou 5-HT_{2C} principales cibles des antipsychotiques atypiques dans la manifestations des effets thérapeutiques des ISRS chez l'animal (Tramblay et Blier, 2006).

ISRS+ Antipsychotique atypique/ISRS	Données précliniques			Données cliniques sur les troubles de l'humeur (4)	Référence
	Electrophysiologie (1)	Microdialyse (2)	Comportement (3)		
(S)Citalopram+Risperidone vs (S)Citalopram	↑ activité électrique 5- HT; NA	↔ 5-HT ; ↑ NA ; ↑ DA		↑ Efficacité ↓ délai d'action	Dremencov et al., 2007 (1); Huang et al., 2006 (2) ; Rapaport et al., 2006 (4)
(S)Citalopram+Aripiprazole vs (S)Citalopram	↑ activité électrique 5- HT; NA et DA		↑ Mobilité (FST)	↑ Efficacité ↓ délai d'action	Chernoloz et al., 2009 (1); Bourin et al., 2009 (3) ; Matthews et al., 2009 (4) ; Berman et al., 2009 (4).
Fluoxétine+Risperidone vs Fluoxetine		↑ 5-HT ; ↑ NA ; ↑ DA in CFx	↑ Mobilité (FST)	↑ Efficacité ↓ délai d'action	Zhang et al., 2000 (2) ; Adachi et al., 2008 (2); Dhir et Kulkarni, 2008 (3) ; Rogóz Z., 2010 (3) ; Ostroff et Nelson, 1999 (4) ; Bondolfi et al., 2002 (4).
Fluoxétine+Olanzapine vs Fluoxétine	↑ activité électrique NA	↑ 5-HT ; ↑ NA ; ↑ DA in CFx	↑ Mobilité (FST)	↑ Efficacité ↓ délai d'action	Seager et al., 2005 (1) ; Zhang et al., 2000 (2) ; Amargós-Bosch et al., 2005 (2) ; Rogóz, 2010 (3) ; Shelton et al., 2001 (4) Thase et al., 2007 (4) ; Tohen et al., 2010 (4).
Sertraline+Quetiapine vs Sertraline				↑ Efficacité ↓ délai d'action	Francobandiera, 2002 (4) ; Dell'Osso et al., 2006 (4)

Tableau 21 : Effets précliniques et cliniques de la combinaisons d'un ISRS avec un antipsychotique atypique.

(Les cases grisées représentent les études non réalisées à ce jour).

C. LE SYSTEME NORADRENERGIQUE ET L'INTERACTION AVEC LE SYSTEME SEROTONINERGIQUE

1. Le système noradrénergique central

Le système noradrénergique central fait également partie des systèmes de neurotransmission qui semblent largement impliqués dans l'anxiété et la dépression. De nombreuses projections noradrénergiques sont retrouvées vers des régions cérébrale jouant un rôle majeur dans l'anxiété et la dépression comme l'hippocampe, le cortex, l'amygdale (**Figure 14**). Dans une étude menée sur des patients atteints d'anxiété généralisée (Sevy et al., 1989), le taux plasmatique de NA chez les malades est augmenté par rapport à celui des patients sains et le nombre de récepteurs α_2 -noradrénergiques est diminué dans le plasma des malades indiquant une régulation négative de ces récepteurs. L'activité du système noradrénergique central semble donc être augmentée chez les patients atteints d'anxiété généralisée et de dépression (Sevy et al., 1989).

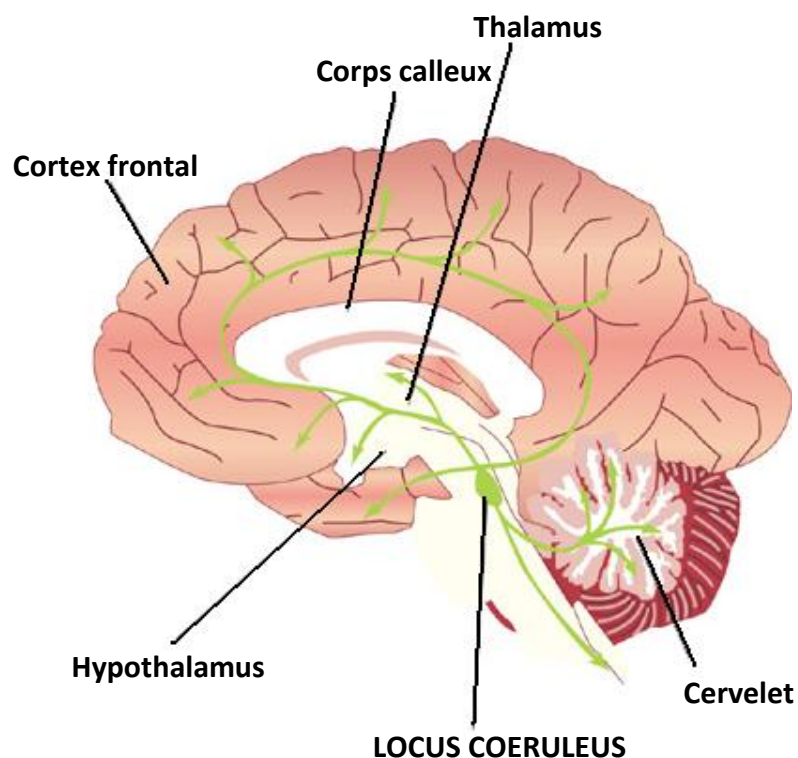


Figure 14 : Schéma des différentes projections noradrénergiques dans le système nerveux central chez l'Homme

Des modifications du taux de NA ont également été rapportées après l'exposition d'animaux à un stress. Celui-ci a été induit par une immobilisation forcée ou par l'administration de chocs électriques au niveau des pattes chez le Rat. Il entraîne une augmentation de la libération de NA mesurée par microdialyse dans le noyau latéral de l'amygdale et dans l'hippocampe (Cecchi et al., 2002 ; Hajos-Korcsok et al., 2003).

Des altérations des récepteurs α_2 -noradrénergiques dans de nombreuses régions cérébrales telles que le cortex frontal, le locus coeruleus, l'hippocampe ou l'amygdale ont été également détectées après une exposition des animaux à un stress aigu ou chronique (Nukina et al., 1987 ; Flugge, 1996). L'implication des récepteurs α_2 -noradrénergiques dans la neurobiologie de l'anxiété et la dépression semble bien établie mais le mécanisme d'action de ces récepteurs reste encore mal compris. Les agonistes de ces récepteurs (e.g. clonidine) semblent engendrer des effets de type anxiolytiques dans certains modèles animaux mais des effets similaires ont également été rapportés pour les antagonistes de ces récepteurs (e.g. idazoxan, yohimbine, rauwolscine) (La Marca et Dunn, 1994 ; Cole et al., 1995 ; Millan et al., 2000b).

De même, des résultats contradictoires sont décrits dans la littérature pour le rôle des récepteurs α_1 adrénergiques dans l'anxiété. Toutefois, la balance semble pencher vers une activité de type anxiogène après stimulation de ces récepteurs (Soderpalm et Engel, 1990 ; Cecchi et al., 2002).

Une haute concentration de récepteurs β_1 - et β_2 -adrénergiques a été observée dans des régions cérébrales fortement impliquées dans les mécanismes des troubles anxieux telles que le cortex, l'amygdale ou l'hippocampe (Rainbow et al., 1984 ; Nicholas et al., 1993), ce qui laisse penser que les récepteurs β -adrénergiques ont un rôle dans le contrôle de l'anxiété. Cependant, les études comportementales chez l'animal n'ont pas encore fait ressortir d'effets anxiolytiques significatifs des ligands spécifiques de ces récepteurs (Cao et Rodgers, 1997 ; Sanchez et al., 2003).

2. Interaction entre les systèmes sérotoninergique et noradrénergique centraux

2.1. Effet de la NA sur le système 5-HT

Il existe de nombreuses relations anatomiques et fonctionnelles entre les systèmes noradrénergique et sérotoninergique centraux. Les noyaux dorsal et médian du raphé reçoivent de nombreuses projections du locus coeruleus (LC) (Baraban et Aghajanian, 1980 ; Berridge et Waterhouse, 2003) qui sont à l'origine d'une régulation d'un système 5-HT par les neurones noradrénergiques. En effet, la lésion des neurones NA issus du LC ou l'inhibition de la synthèse de la NA par un inhibiteur de la tyrosine hydroxylase (enzyme clef de la synthèse de NA) ou de la dopamine β -hydroxylase, deuxième enzyme impliquée dans la synthèse de NA, produit une augmentation nette de la synthèse de 5-HT dans le raphé (Saavedra et al., 1976) ce qui suggère un rôle inhibiteur de la NA sur les neurones 5-HT. L'effet inhibiteur de la NA sur le système 5-HT semble être porté par l'activation des récepteurs α_2 -noradrénergiques. Des études *in vitro* menées sur des coupes de cortex, de raphé dorsal et médian et d'hippocampe de rat, montrent que la perfusion d'agoniste des récepteurs α_2 -noradrénergiques (clonidine, oxymétazoline, dexmedetomidine et UK 14304) inhibe la libération de 5-HT (Jackisch et al., 1999 ; Hopwood et Stanford, 2001). L'effet inhibiteur d'une perfusion de dexmedetomidine sur la libération de 5-HT dans le raphé est bloqué par la perfusion d'antagoniste spécifique des récepteurs α_{2A} -noradrénergiques, le BRL 44408, mais pas par un antagoniste des récepteurs $\alpha_{2B/C}$ -noradrénergiques, le ARC 239 (Hopwood et Stamford, 2001). Dans cette étude *in vitro*, l'application de NA entraîne également un effet inhibiteur sur la libération de 5-HT et cet effet est annulé par des antagonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, comme la yohimbine et la rauwolscine. La NA endogène a donc un effet inhibiteur sur la 5-HT par la stimulation des récepteurs α_2 -noradrénergiques.

Les récepteurs α_2 -noradrénergiques sont localisés au niveau présynaptique sur les neurones NA (autorécepteurs) mais également sur les terminaisons axonales des neurones 5-HT (hétérorécepteurs) (French, 1995). Les mesures de la libération de 5-HT *in vivo* sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro*. L'administration d'agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, le UK 14304, la clonidine et le S 18616, diminue la libération de 5-HT dans le raphé dorsal et dans le cortex frontal chez le rat anesthésié. De plus, l'idazoxan, le BRL 44408 et la mirtazapine, trois antagonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques, antagonisent l'effet inhibiteur des agonistes de ces récepteurs (Haddjeri et al., 1996 ; 1997 ;

Millan et al., 2000a). Certaines de ces études font apparaître que l'inhibition induite par les agonistes des récepteurs α_2 -noradrénergiques implique les hétérorécepteurs présents sur les neurones 5-HT (Numazawa et al., 1995 ; Haddjeri et al., 1996 ; 1997) tandis que d'autres études montrent qu'une destruction des neurones NA par des neurotoxines, la 6-hydroxydopamine (6-OHDA) ou du DSP-4 (qui détruit uniquement les neurones NA issus du LC) rend les neurones du raphé insensibles à l'effet inhibiteur de la clonidine administrée par voie intraveineuse (Bortolozzi et Artigas, 2003). Cette différence de résultats s'expliquerait par le fait que la clonidine agirait de façon différente selon la dose utilisée à faible dose la clonidine augmente la libération de 5-HT par en inhibant la libération de NA (activation des autorécepteurs), tandis qu'à forte dose, elle diminue la libération de 5-HT par stimulation des hétérorécepteurs présents sur les terminaisons axonales 5-HT (Mongeau et al., 1993).

Les récepteurs α_1 -noradrénergiques semblent exercer un effet opposé à celui des récepteurs α_2 -noradrénergiques. L'activation de ces récepteurs par injection d'agoniste, la cirazoline et la phényléphrine, localement dans le cortex préfrontal ou le raphé médian chez le Rat, entraîne une augmentation de la libération de 5-HT dans ces régions cérébrales. Cet effet est inhibé par la co-perfusion d'un antagoniste des récepteurs α_1 -noradrénergiques, la prazosine (Adell et Artigas, 1999 ; Amargos-Bosch et al., 2003). De plus, une administration locale systémique ou sous cutanée de prazosine diminue de la libération de 5-HT dans le raphé dorsal et dans l'hippocampe (Millan et al., 2000a ; Bortolozzi et Artigas, 2003 ; Weikop et al., 2004). Des résultats opposés sont observés dans deux études *in vitro* puisque dans l'une, l'application de phényléphrine sur des coupes de raphé dorsal et médian de rat diminue la libération de 5-HT (Judge et Gartside, 2006), tandis que dans l'autre, une haute concentration de phényléphrine cause une augmentation dose-dépendante de la décharge des neurones de ces deux structures (Hopwood et Stamford, 2001).

2.2. Effet de la 5-HT sur le système NA

Dans le sens inverse, la lésion des noyaux du raphé augmente l'activité de la tyrosine hydroxylase dans le LC (McRae-Degueurce et al., 1982) et le prétraitement avec un inhibiteur de synthèse de la 5-HT le parachlorophénylalanine (p-CPA) augmente l'activité de la tyrosine hydroxylase et la décharge des neurones NA du LC (Crespi et al., 1980 ; Reader et al., 1986).

Ceci suggère un rôle inhibiteur de la NA sur les neurones 5-HT via différents récepteurs sérotoninergiques.

Les récepteurs 5-HT_{1A} sont localisés sur les dendrites des neurones 5-HT du raphé en tant qu'autorécepteurs inhibiteurs mais peuvent aussi être localisés au niveau post-synaptique dans l'hippocampe, le septum, l'amygdale, le cortex et le locus coeruleus. Les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT, flesinoxan ou MDL 73005EF) augmente de la libération de NA dans le cortex frontal, l'hippocampe, l'hypothalamus et le LC chez le Rat (Clement et al., 1992 ; Suzuki et al., 1995 ; Hajos-Korcsok et al., 1999 ; Suwabe et al., 2000 ; Pudovkina et al., 2001 ; Szabo et Blier, 2001). Cet effet des agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} n'est pas bloqué par une lésion préalable du système 5-HT (injection de la 5,7-DHT, une neurotoxine, dans le raphé) ou par l'administration d'un inhibiteur de synthèse de la 5-HT (la p-CPA) (Suzuki et al., 1995; Hajos-Korcsok et al., 1999) ce qui démontre un effet des agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} au niveau post-synaptique. La quantité de récepteurs 5-HT_{1A} est faible dans le LC, suggérant que les agonistes de récepteurs 5-HT_{1A} stimulent l'activité noradrénergique centrale par une action sur les afférences du LC.

A l'inverse, les récepteurs 5-HT₂ auraient un effet inhibiteur sur la libération de NA (Clement et al., 1992). L'administration sous-cutanée de DOI ou de DOB (deux agonistes des récepteurs 5-HT_{2A/2C}) diminue la libération de NA dans l'hippocampe et le LC. Ces effets sont inhibés par l'administration de DOI en présence d'un antagoniste non spécifique des récepteurs 5-HT₂ comme la ritansérine et la kétansérine (Gorea et Adrien, 1988 ; Done et Sharp, 1992).

Les récepteurs 5-HT₂ agissant sur la NA sont localisés au niveau post-synaptique puisqu'une lésion des neurones 5-HT n'entraîne aucune modification de l'effet des agonistes DOB ou quipazine (Gorea et Adrien, 1988). L'effet des récepteurs 5-HT₂ sur l'activité des neurones du LC peut être lié à l'activation des récepteurs 5-HT₂ présents sur des afférences du LC. L'inhibition observée consécutive à l'activation des récepteurs 5-HT₂ peut également être due à la stimulation de ces récepteurs présents sur les interneurons GABA du LC (Szabo et Blier, 2001 ; Blier, 2003) (**Figure 15**).

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

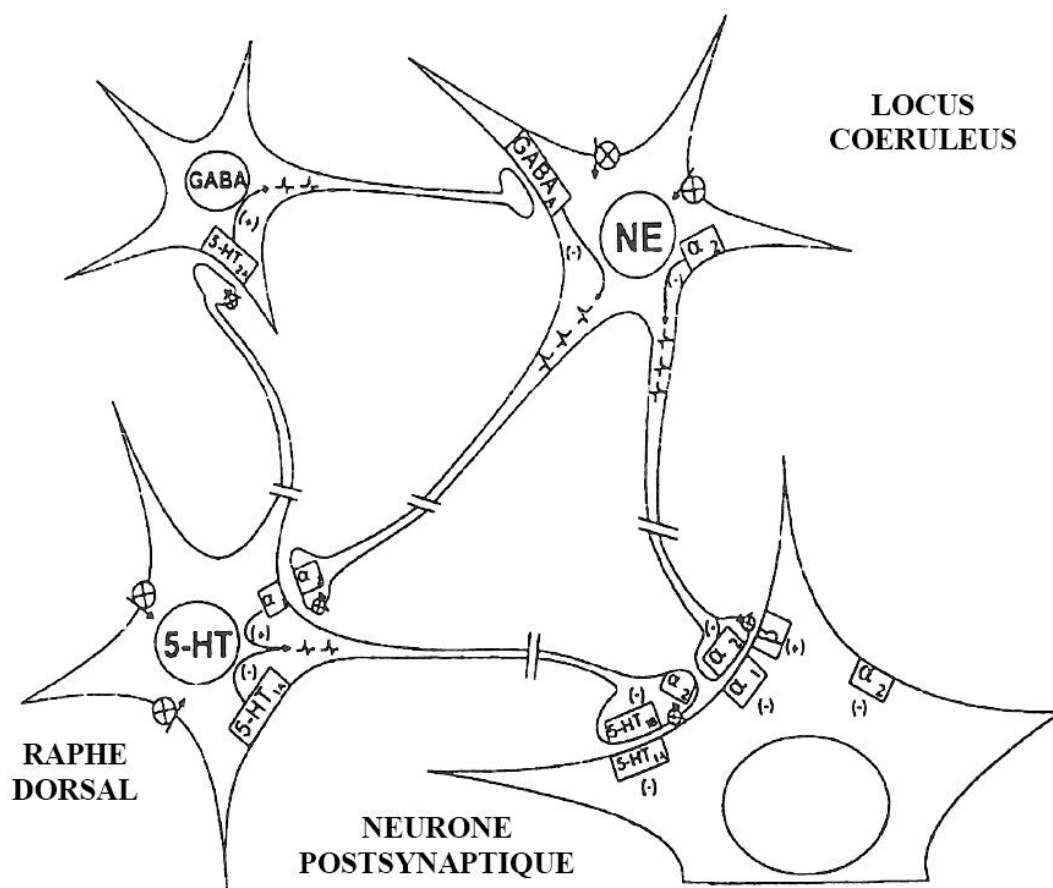


Figure 15 : Influence des neurones sérotoninergiques sur l'activité de neurones noradrénergiques dans le locus coeruleus (D'après Biler, 2003)

3. Impact des ISRS sur le système noradrénergique

En microdialyse, les ISRS tels que la paroxétine, la fluoxétine, le citalopram ou le escitalopram ont la capacité d'augmenter significativement la concentration de NA dans de nombreuses régions cérébrales comme le cortex frontal ou l'hippocampe chez le Rat et chez la Souris (Jordan et al., 1994; Hughes and Stanford, 1996; Shachar et al., 1997; Hughes and Stanford, 1998; Millan et al., 2001; Beyer et al., 2002; Bymaster et al., 2002; Koch et al., 2002; David et al., 2003; Kobayashi et al., 2008 ; Nguyen et al., 2011). A la lumière de notre revue bibliographique, on voit bien qu'il existe plusieurs hypothèses quant à la capacité des ISRS à modifier les concentrations extracellulaires de NA. La première hypothèse suppose que les ISRS agissent de manière non spécifique sur le transporteur de la NA. L'étude de la recapture de [³H] NA *in vitro*, sur des synaptosomes du cerveau de rat a montré la capacité des ISRS à inhiber la recapture de NA (Hughes et Stanford, 1996). Owens et al., 2000 ont également montré que la paroxétine inhibe l'activité fonctionnelle du transporteur de la NA en agissant sur le site de liaison de la désipramine. De plus, l'augmentation de la quantité extracellulaire de NA après l'administration d'ISRS est abolie par un prétraitement avec une neurotoxine du système NA, suggérant que les ISRS peuvent directement se lier aux transporteurs de la NA localisés sur les neurones noradrénergiques (Hughes et Stanford, 1998 ; Owens et al., 2008). La seconde hypothèse suggère une action indirecte des ISRS sur le transporteur de la NA. L'administration d'ISRS augmenterait ainsi la concentration extracellulaire de 5-HT qui augmenterait, à son tour, la libération de NA. Un des objectifs de mon travail de thèse a été d'évaluer ces hypothèses *in vivo* chez la souris.

En conclusion

L'ensemble de ces données montrent que les neurones monoaminergiques entretiennent de relations anatomiques et fonctionnelles réciproques étroites (Guiard et al., 2008) faisant intervenir des mécanismes complexes (**Figure 16**). Ces modalités ne sont pas encore complètement connues, en particulier en ce qui concerne le niveau auquel ils interviennent. En effet si ces systèmes interagissent au niveau des corps cellulaires (NDR, LC et ATV), il est également nécessaire de prendre en considération ces interactions au niveau terminal, qui parfois sont différentes de celle décrites au niveau somatodendritiques.

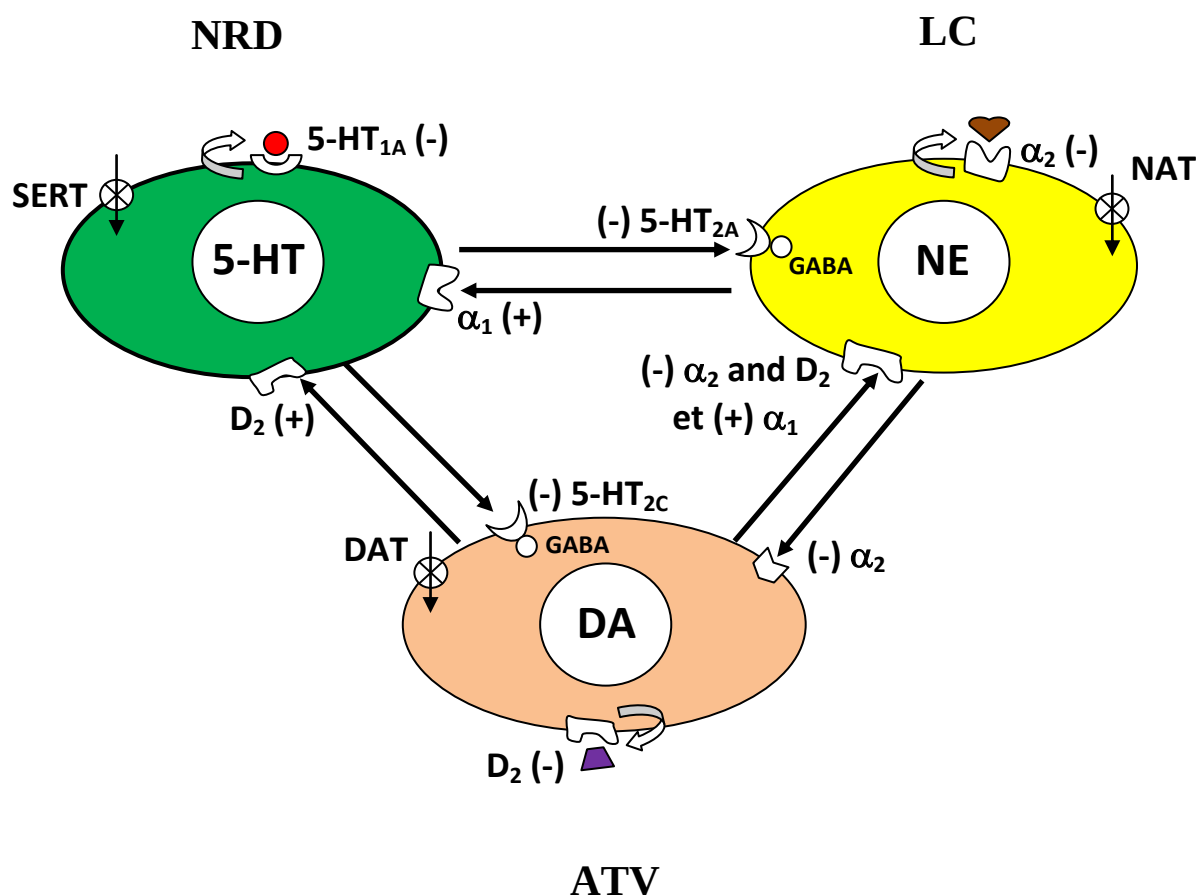


Figure 16 : Schéma des modalités d'interactions possibles entre les neurones monoaminergiques centraux au niveau des corps cellulaires (Adapté d'après Tremblay et Blier, 2006)

Matériel & Méthodes

1. Animaux

L'ensemble des animaux a été hébergé au sein du Service Commun Animalerie de la Faculté (SCA) dans des cages d'élevage standard, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture (cycle jour/nuit : 12h/12h non inversé). La température des pièces était maintenue à un niveau constant de +22°C.

Plusieurs souches de souris sauvages ou mutantes pour des récepteurs ou pour le transporteur de la sérotonine ont été utilisées lors de ce travail (**Tableau 22**):

Souches de souris	Génotype	Cible de la mutation	Nature de la mutation	Références bibliographiques
129sv	SERT +/+	Transporteur de la sérotonine		
129sv	SERT -/-		Constitutive	Bengel et al., 1998
C57BL6J	5-HT _{1A} +/+	Récepteur de la sérotonine		
C57BL6J	5-HT _{1A} -/-		Constitutive	Parks et al., 1998
129sv x C57BL6J	5-HT _{1A} +/+			
129sv x C57BL6J	5-HT _{1A} -/-		Conditionnelle (dans le NDR)	Richardson-Jones et al., 2010
C57BL6J	5-HT _{1A/1B} +/+			
C57BL6J	5-HT _{1A/1B} -/-		Constitutive	Guilloux et al., 2011
C57BL6J	5-HT _{2A} +/+			
C57BL6J	5-HT _{2A} -/-		Constitutive	Weisstaub et al., 2006
129sv	5-HT _{2C} +/+			
129sv	5-HT _{2C} -/-		Constitutive	Tecott et al., 1995
129sv x C57BL6J	5-HT _{2A/2C} -/-		Constitutive	

Tableau 22 : Les souris utilisées dans cette étude

Les études de microdialyse intracérébrale, d'électrophysiologie et de comportement ont été réalisées chez des souris mâles âgées de 8 à 12 semaines (poids 25 à 35 grammes). Les animaux utilisés comme contrôles (mutés et/ou non traités) étaient issues des mêmes portées (« littermates »).

Au cours de ce travail de thèse, J'ai réalisé toutes les expériences de microdialyse intracérébrale et d'électrophysiologie qui sont décrites dans ce mémoire. Je décrirai donc en détails ces deux techniques en terminant par une comparaison de leurs principaux avantages et inconvénients.

En ce qui concerne le test de la nage forcée (FST) qui est un test comportemental prédictif de l'activité de type-antidépresseur d'une molécule, j'ai observé le déroulement de ce test dont la réalisation chez la souris a été effectuée au laboratoire par le Dr Denis DAVID .

Enfin, l'expérience de recapture (ou « uptake ») des monoamines sur des synaptosomes dont les résultats sont présentés dans ce travail de thèse, a été réalisée par Alexandre BACQ, étudiant en thèse dans le laboratoire du Dr Sophie GAUTRON (INSERM U952, de l'Université Paris VI). Elle ne sera donc décrite que très brièvement.

2. Microdialyse intracérébrale *in vivo* chez la souris

2.1. Principe

La technique de microdialyse *in vivo*, chez l'animal anesthésié ou éveillé, a été mise au point par le groupe de Delgado en 1972, puis perfectionnée par Ungerstedt en 1984. Son principe repose sur la loi de diffusion passive de composés de faibles poids moléculaires à travers une membrane poreuse, du compartiment le plus concentré en neurotransmetteurs (l'espace extracellulaire synaptique) vers le compartiment le moins concentré (la sonde de dialyse perfusée avec une solution tampon à pH physiologique ne contenant pas de neurotransmetteurs). Cette technique, appliquée dans notre laboratoire chez la souris éveillée, libre de ses mouvements, permet le recueil d'échantillons (dialysats) toutes les 15 ou 30 minutes avec des débits de 0,5 à 1,5 µl/min selon le protocole expérimental et la région cérébrale dialysée. Ces échantillons contiennent, entre autres, la sérotonine (5-HT), son métabolite principal (5-HIAA), ainsi que la noradrénaline (NA), la dopamine (DA) et leurs métabolites. Ces molécules sont ensuite quantifiées par une méthode analytique de dosage impliquant une chromatographie liquide haute performance (CLHP) couplée à un détecteur électrochimique. Les concentrations de neurotransmetteurs mesurées reflètent l'équilibre physiologique entre le mécanisme de libération calcium-dépendant du neurotransmetteur et

celui de sa recapture par le transporteur sélectif (par exemple, SERT ou 5-HTT pour la sérotonine) par les neurones présynaptiques. Une étude complète de microdialyse intracérébrale comporte 4 phases : **(1)** l'implantation chirurgicale de la sonde par stéréotaxie sous anesthésie, **(2)** le recueil des dialysats (valeur basale des concentrations extracellulaires du neurotransmetteur avant traitement, puis 2 à 3 heures après le traitement), **(3)** le prélèvement des cerveaux en vue de la vérification précise du site d'implantation de la membrane de microdialyse et **(4)** l'analyse chromatographique des dialysats.

Les sondes de microdialyse sont composées d'un capillaire d'entrée, et d'un capillaire de sortie et, au laboratoire, d'une membrane en cuprophane perméable, laissant passer les molécules de poids moléculaires inférieurs à 6000 Daltons (**Figure 17**) dont 5-HT, la NA et la DA.

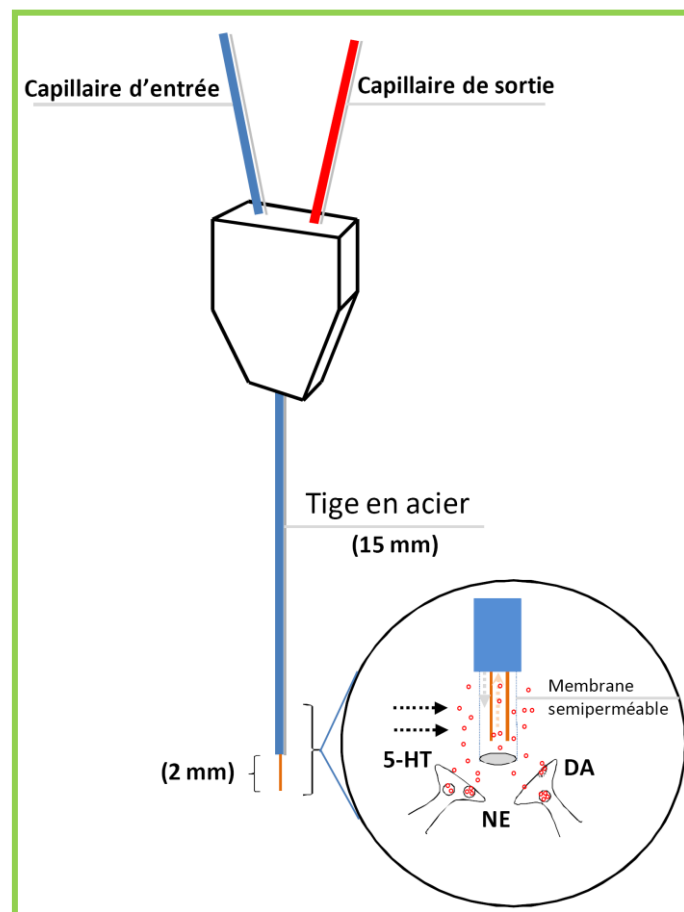


Figure 17 : Principe de fonctionnement d'une sonde de microdialyse intracérébrale. Les monoamines libérées par les terminaisons neuronales présynaptiques diffusent à travers la membrane de microdialyse en cuprophane qui est perméable aux molécules de faible poids moléculaires.

2.2. Chirurgie de l'implantation des sondes de microdialyse

Les souris ont été anesthésiées à l'aide d'hydrate de chloral (400 mg/kg ; i.p.), puis placées sur un appareil stéréotaxique afin de les maintenir immobile grâce à des barres d'oreilles et un étau buccal fixant la mâchoire supérieure. L'appareil stéréotaxique permet le déplacement avec une grande précision d'un bras muni de vis micrométriques portant la sonde de dialyse dans les trois dimensions (Antéro-postérité, Latéralité et Ventralité). Après incision longitudinale de la peau du crâne, celle-ci est écartée et l'os crânien nettoyé avec de l'eau oxygénée (10 volumes). Le bregma, point d'intersection des lignes de suture des os du crâne est alors visible et sert de point de référence (point «zéro») antéro-postérité et latéral (**Figure 18**). Avant chaque implantation la position horizontale de la tête de l'animal est vérifiée en s'assurant que la différence de hauteur entre le bregma et la lambda ne dépasse pas 35 μm .

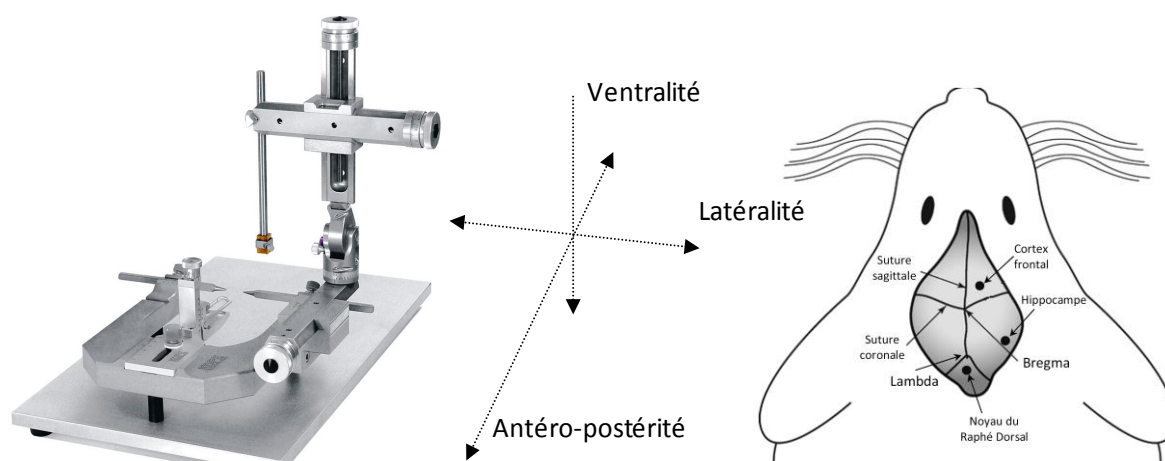


Figure 18 : Descriptions des repères anatomiques nécessaires à l'implantation correcte des sondes de microdialyse.

A partir de ce point et grâce aux coordonnées données par l'atlas stéréotaxiques de la souris (Hof et al., 2000) (**Tableau 23**), l'os du crâne est percé manuellement à l'aide d'une aiguille Terumo (gauge 23G), en deux points symétriquement opposés pour le cortex frontal ou l'hippocampe (régions symétriques, présentes dans chaque hémisphère) ou en un seul point pour le noyau du raphé dorsal. La surface de la dure mère constitue le point de coordonnée «zéro» de l'axe ventral. La sonde est descendue manuellement et très lentement à raison d'un millimètre (mm) par minute pour limiter les conséquences de la destruction tissulaire, puis collée à l'os crânien avec du ciment dentaire (GACD, Paris, France). Après cette étape de chirurgie, les souris sont placées isolément dans des cages cylindriques en plexiglas dans

lesquelles elles sont libres de leurs mouvements et ont un accès *ad libitum* à de l'eau et à de la nourriture. Environ 20 heures après la chirurgie, les animaux sont prêts à être utilisés pour les expériences de microdialyse.

Structures cérébrales	Coordonnées stéréotaxiques (en mm/Bregma)		
	Antériorité	Latéralité	Ventralité
Cortex frontal	+ 1,6	± 1,3	- 1,6
Hippocampe	- 2,8	± 3	- 4
Noyau du Raphé Dorsal	- 4,5	0	- 4

Tableau 23 : Coordonnées stéréotaxiques des principales régions monoaminergiques étudiées chez la Souris. (D'après Hof et al., 2000).

2.3. Microdialyse intracérébrale

1) Microdialyse conventionnelle

L'ensemble de la procédure et son principe sont rappelés dans la **figure 19**. Le jour de la dialyse, l'entrée des sondes est reliée à un perfuseur automatique (CMA 100, Phymep, Paris) délivrant une solution tampon préparée et filtrée (filtre HATF 0,45 µm, Millipore) par nos soins et dont la composition, décrite ci-dessous, est proche de celle du liquide céphalorachidien (LCR) (**Tableau 24**) :

Composants	Concentration (mM)
NaCl	147
KCl	2,5
MgCl ₂	1,2
CaCl ₂	1,26
NaHCO ₃	25
NaH ₂ PO ₄	1
Eau Milipore	qsp 500 ml
pH	7,4±0,2

Tableau 24 : Composition du liquide céphalo-rachidien (LCR) artificiel

Cette solution tampon artificielle est donc délivrée de manière continue et diffuse à travers la membrane de dialyse (**Figure 19**). Après 1 à 2 heures de stabilisation, les 4 à 6 premiers échantillons sont recueillis par le capillaire de sortie, de manière à établir la moyenne des concentrations extracellulaires basales de 5-HT ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$), de NA ($[\text{NA}]_{\text{ext}}$) et/ou de DA ($[\text{DA}]_{\text{ext}}$) pour chaque souris. Les effets des substances pharmacologiques à étudier (antidépresseurs) par voies intra-péritonéale (i.p.) ou sous cutanée (s.c.) sous un volume de 0.5 ml/20g de poids corporel sont comparés aux effets de leur solvant administré comme contrôle. Pour le recueil de la NA et de la DA, les tubes eppendorf sont placés dans de la glace afin de protéger ces catécholamines de leur dégradation à la température ambiante.

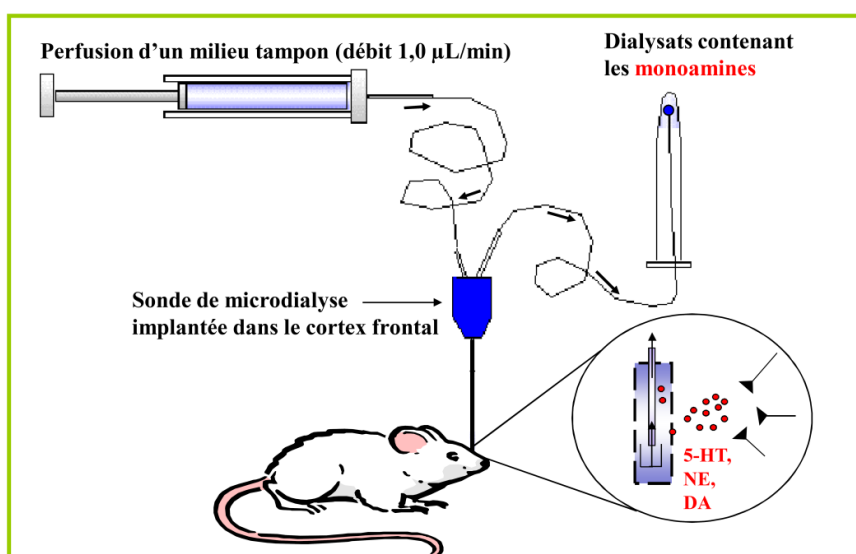


Figure 19 : Schéma représentant une expérience de microdialyse intracérébrale *in vivo* chez la souris éveillée libre de ses mouvements.

A la fin de la séance de microdialyse, les souris sont euthanasiées par une injection létale d'hydrate de chloral. Les cerveaux sont prélevés, puis conservés dans une solution de PFA 4% (paraformaldéhyde) à +4°C dans un réfrigérateur avant leur analyse histologique.

2) Injection locale dans une région cérébrale donnée (« reverse dialysis »)

Chacune des substances étudiées sera dissoute dans une solution tampon mimant le liquide céphalorachidien (LCR) et la concentration de la solution est adaptée en fonction du volume injecté. D'abord, la solution normale de LCR (sans substances) est délivrée de

manière continue et diffuse à travers la membrane de dialyse. Après 1 à 2 heures de stabilisation, les 4 à 6 premiers échantillons sont recueillis par un capillaire de sortie, de manière à établir la moyenne des concentrations extracellulaires basales de 5-HT ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$), de NA ($[NA]_{\text{ext}}$) et/ou de DA ($[DA]_{\text{ext}}$) pour chaque souris. La seringue et le cathéter sont ensuite remplis de la solution tampon artificielle contenant la molécule à étudier à concentrations variables. Les effets de ces substances pharmacologiques sont calculés en pourcentage de variations des concentrations basales de neurotransmetteurs.

2.4. Histologie cérébrale : vérification de l'implantation de la membre de microdialyse

Les cerveaux sont placés sur un microtome à congélation (-25°C) et différentes coupes d'une épaisseur de $40\text{ }\mu\text{m}$ (Bert et al., 2004) sont réalisées dans la zone d'implantation des sondes de microdialyse ($500\text{ }\mu\text{m}$ avant et $500\text{ }\mu\text{m}$ après la zone d'implantation). Ces coupes sont photographiées grâce à un appareil photo numérique, puis comparées à celles de l'atlas stéréotaxique du cerveau de souris (Hof et al., 2000) (**Figure 20**).

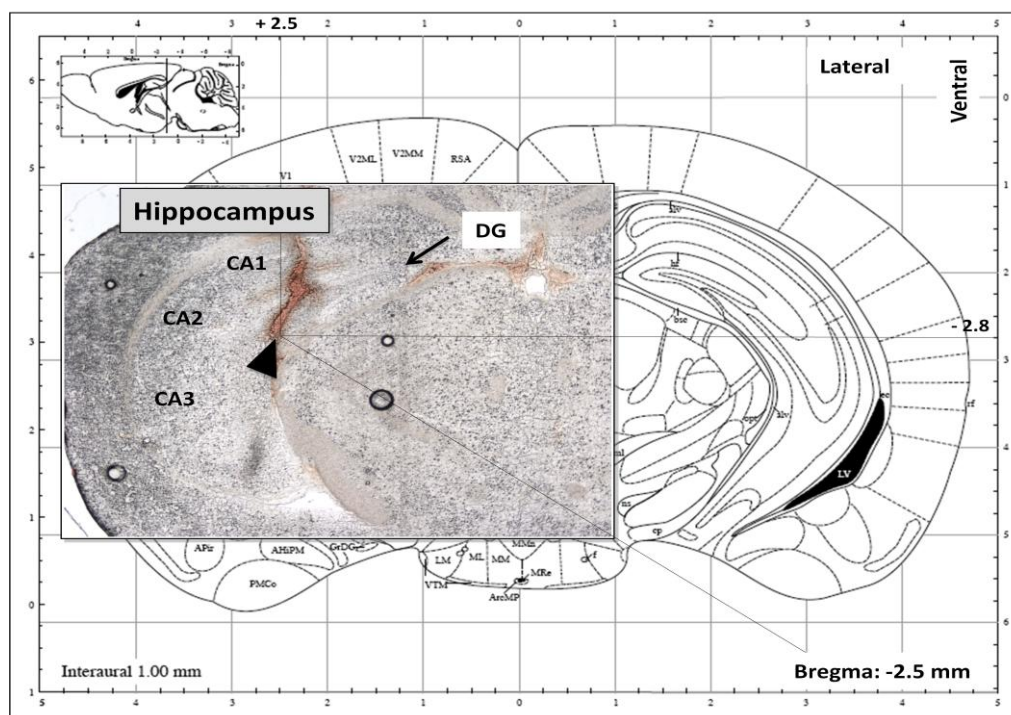


Figure 20 : Superposition d'une photo numérique d'une coupe de cerveau (à gauche) et d'une coupe de l'atlas stéréotaxique (à droite) correspondant à l'hippocampe de souris.
La flèche noire indique l'extrémité de la sonde de microdialyse.

2.5. Dosage des neurotransmetteurs par CLHP

1) Dosage de la 5-HT et de la DA

L'analyse des dialysats contenant la 5-HT, son métabolite (5-HIAA) et la DA a été effectuée selon une méthode décrite par Malagie et al. (2001). Le système chromatographique est constitué d'une pompe LC-118 fournit un débit (0,7 ml/min) de la phase mobile, préalablement filtrée (filtre 0,22 μ m, Millipore) (Beckman Coulter, Roissy, France) et est composé d'un amortisseur de pulsation, d'un injecteur automatique et d'une colonne (phase stationnaire). La composition de la phase mobile est la suivante (**Tableau 25**) :

Composants	Concentration (mM)
NaH ₂ PO ₄	112,5
EDTA	0,15
Acide octanosulfonique	0,81
Méthanol (pureté 99,8%)	17,5%
Eau Millipore	qsp 2000 ml
pH	4,2

Tableau 25 : Composition de la phase mobile permettant le dosage de la 5-HT et DA

Avant d'analyser les dialysats, une courbe de calibration est réalisée à partir de l'injection d'une solution standard de concentration connue (5-HT: 2,6 fmol/ μ l ; 5-HIAA: 0,05 fmol/ μ l et DA: 2,3 fmol/ μ l) injectée à trois volumes différents (5, 10 et 19 μ L). Chaque point de la gamme étalon est analysé en triplicate afin d'obtenir une courbe de calibration de 9 points. Le coefficient de corrélation R^2 est calculé avec un seuil fixé à 99%. La limite de sensibilité de la méthode analytique de dosage est de l'ordre de 0,1 fmol/20 μ l d'échantillon (rapport signal sur bruit de fond = 2).

2) Dosage de la NA

L'analyse des dialysats contenant la NA est également effectuée selon une méthode décrite par notre laboratoire (Malagié et al., 2001). Le système chromatographique est constitué d'une pompe LC-118 qui permet d'assurer un débit fixe (0,7 ml/min) d'une phase mobile, préalablement filtrée (filtre 0,22 µm, Millipore) (Dionex, France), d'un amortisseur de pulsation, d'un injecteur automatique et d'une colonne (phase stationnaire). La composition de la phase mobile diffère légèrement de la précédente : **(Tableau 26)** :

Composants	Concentration (mM)
NaH ₂ PO ₄	112,5
EDTA	0,15
Acide octanosulfonique	3
Méthanol (pureté 99,8%)	5%
Eau Millipore	qsp 2000 ml
pH	3,0

Tableau 26 : Composition de la phase mobile permettant le dosage de la NE

2.6. Principaux avantages et inconvénients de la technique de microdialyse

Avantages	Inconvénients
• Outil d'étude préclinique du métabolisme tissulaire. • Permet également d'apporter <i>in situ</i> des molécules exogènes, avec des dégâts minimes au tissu, puisqu'il n'y pas d'échanges de liquide au niveau de la sonde. • Chez une même souris, il est possible d'implanter une sonde dans les noyaux du raphé (corps cellulaires), et 1 sonde dans une région terminale (hippocampe, cortex frontal), donc d'étudier un circuit neuronal. • L'animal utilisé peut être dialysé pendant deux jours consécutifs. Chaque animal peut être utilisé comme son propre témoin suite par exemple à un traitement pharmacologique. • Nombre d'animaux = 10 à 12 par groupe. • Animaux vigils et libres de leurs mouvements pendant l'expérimentation pharmacologique. • Corrélation possible avec le comportement	• Coût des sondes commerciales et difficulté d'en fabriquer « artisanalement ». • Contrôle de la qualité de l'implantation <i>a posteriori</i>. • Important diamètre de la sonde (0.3 mm). • Implantation assez approximative de la membrane (il faut surtout vérifier l'emplacement de l'extrémité de la membrane). • Résolution temporelle encore relativement faible (10-15 minutes entre chaque échantillon). • En lien avec le débit de perfusion du tampon extracellulaire (1 µl/min) avec un dialysat toutes les 15-20 minutes. • 1 souris par 1 jour pour 1 expérimentateur. • Expérience longue (3 à 6 mois) pour évaluer les effets de plusieurs doses d'un ligand par rapport à un groupe contrôle (souris traitées avec le véhicule ; souris wild-type (WT)). • Faible valeur pronostique des concentrations extracellulaires basales de 5-HT, DA ou NA. • En ce qui concernent les antidépresseurs, peu d'intérêt de mesurer les concentrations extracellulaires des métabolites comme le 5-HIAA (on sait qu'elles baissent, de façon indépendante de la dose d'IRSS, et ces variations ne sont pas liées à l'activité neuronale [Bel et Artigas, 1996]). • Effet du stress, manipulation des animaux délicates, cela nécessite donc un expérimentateur chevronné !

Tableau 27: Des avantages et inconvénients de la technique de microdialyse

3. Electrophysiologie intracérébrale *in vivo* sur chez la souris anesthésiée

3.1. Principe

L'enregistrement extracellulaire mesure les variations de fréquence des potentiels d'action au voisinage d'une cellule à travers la résistance constituée par le milieu extracellulaire. Du fait de la moindre résistance électrique du milieu, les potentiels enregistrés sont de faible amplitude (de l'ordre du microvolt) mais reflètent fidèlement les fluctuations électriques de la membrane cellulaire. Suivant les options de filtrage utilisées, le potentiel extracellulaire peut être ainsi considéré comme la dérivée seconde du potentiel transmembranaire (Grace et Bunney, 1983a,b) (**Figure 21**).

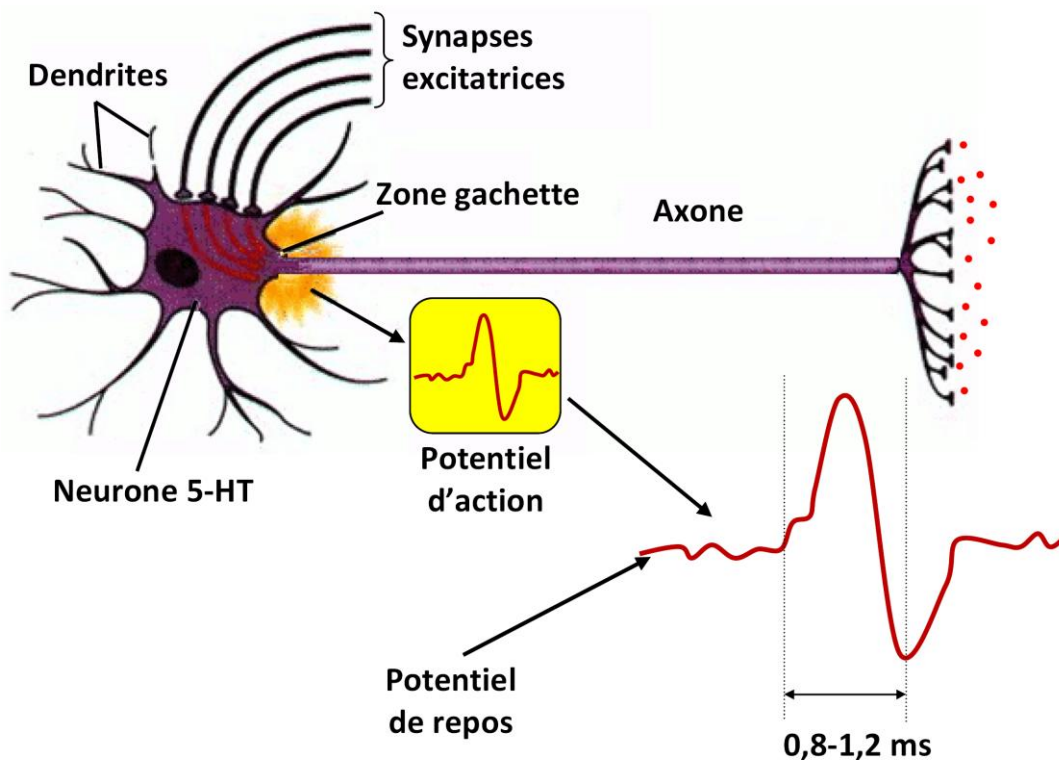


Figure 21 : Schéma de la mesure d'un potentiel d'action d'un neurone 5-HT détecté à l'aide d'une enregistrement extracellulaire dans la région des corps cellulaires situés dans le NRD.

3.2. Enregistrement extracellulaire des neurones sérotoninergiques du NRD

Les enregistrements extracellulaires ont été effectués à l'aide de micropipettes de verre à un seul baril (Stoelting, UK) contenant du NaCl 2 M. Ces micropipettes sont préalablement chauffées et étirées à l'aide d'une étireuse (Narishige, Japon) afin d'obtenir une électrode dont la résistance varie entre 4 et 7 mΩ.

Les souris ont été anesthésiées avec une solution d'hydrate de chloral (dose de 400 mg/kg i.p.). Elles ont ensuite été placées dans un appareil stéréotaxique afin de réaliser une incision au niveau du scalp de manière à visualiser le bregma, le lambda et la suture médiane. La trépanation du crâne a été réalisée sur le lambda à l'aide d'une fraiseuse dentaire. Les neurones sérotoninergiques présumés situés dans le noyau du raphé dorsal (NRD) sont généralement rencontrés à une distance de -2,5 mm à partir de la surface du cerveau. Ces neurones ont été identifiés en utilisant les critères d'Aghajanian (1978): une fréquence de décharge lente (0,5-2,5 Hz), régulière et des potentiels d'action de longue durée (0,8 à 1,2 ms) (**Figure 21**). Dès que le signal d'un neurone sérotoninergique est détecté, l'acquisition du signal a été déclenchée sur l'ordinateur. Après identification du neurone 5-HT, on a procédé à un enregistrement de la fréquence de décharge spontanée (témoin). Le caractère unitaire de l'enregistrement est vérifié avant de procéder aux tests pharmacologiques.

Les effets des différents agents pharmacologiques sur la décharge des neurones 5-HT du NDR, ont été déterminés en mesurant le pourcentage d'augmentation ou de diminution de la fréquence basale. Dans ce type d'expérience, un seul neurone a été étudié par souris et à la fin de chaque enregistrement, un agoniste et un antagoniste des autorécepteurs 5-HT_{1A} ou des hétérorécepteurs 5-HT_{2A/2C} a été administré de manière à valider pharmacologiquement la nature sérotoninergique du neurone (**Figure 22**). Il est également possible d'enregistrer plusieurs neurones par souris afin de comparer la moyenne de décharge de ces neurones sérotoninergiques entre un animal sauvage vs un animal muté (par exemple, sur le gène codant pour le transporteur ou pour un récepteur de la sérotonine) ou entre un animal contrôle vs un animal traité de façon chronique avec un antidépresseur.

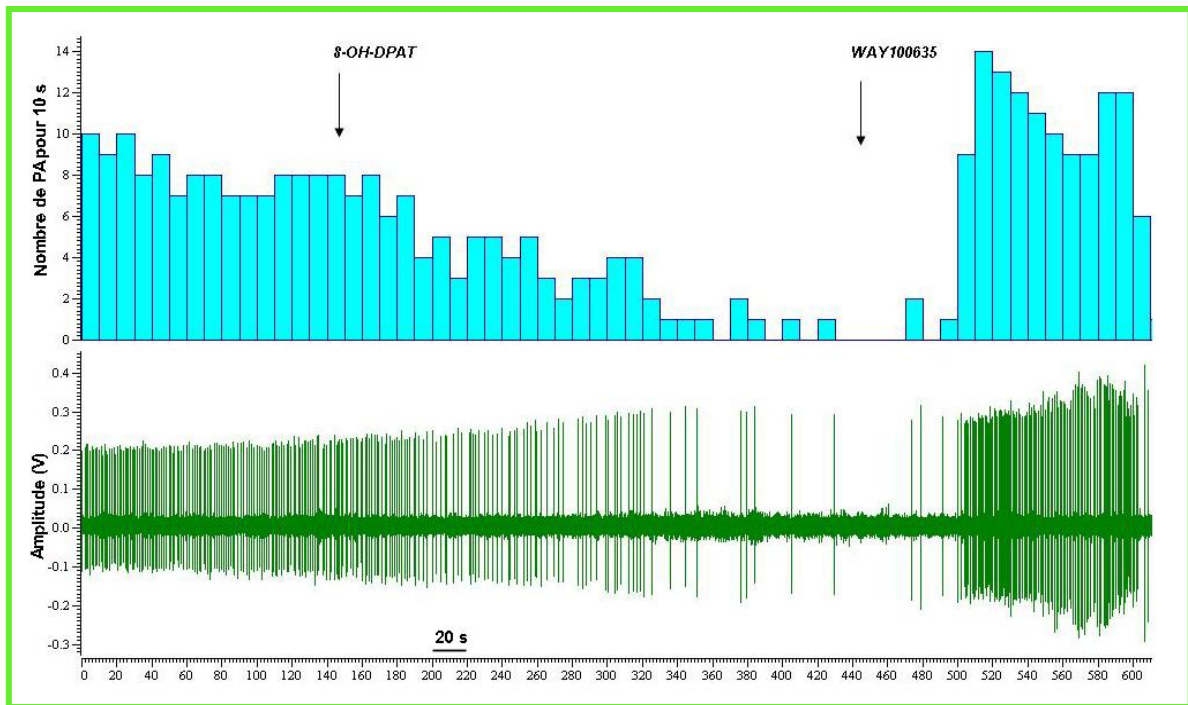


Figure 22 : Exemple d'un enregistrement d'un neurone sérotoninergique.

Les principales caractéristiques de ces neurones reposent sur le fait qu'il déchargent en conditions basales à une fréquence comprise entre 0,5 à 2 Hertz (5 à 20 potentiels d'actions / 10 secondes) et que cette décharge est régulière. Sur cet exemple la nature sérotoninergique du neurone a été vérifiée pharmacologiquement en montrant que l'injection d'un agoniste des autorécepteurs 5-HT_{1A}, le 8-OHDPAT inhibe l'activité électrique du neurone, cet effet étant inversé par un antagoniste sélectif des récepteurs 5-HT_{1A}, le WAY100635.

3.3. Principaux avantages et inconvénients de la technique d'électrophysiologie

Avantages	Inconvénients
• Faible coût des électrodes d'enregistrement commerciales. • Permet également d'apporter <i>in situ</i> des molécules exogènes (microiontophorèse), avec des dégâts minimes au tissu, puisqu'il n'y pas d'échanges de liquide au niveau de l'électrode. • Chez une même souris, il est possible d'implanter une électrode dans les noyaux du raphé (corps cellulaires), et 1 électrode dans une région terminale (hippocampe, cortex frontal), donc d'étudier un circuit neuronal. Possibilité d'enregistrer simultanément deux régions. • Pas besoin de contrôler le site d'implantation de l'électrode. Différents paramètres électrophysiologiques permettent de déterminer <i>en direct</i> la nature des neurones enregistrés et donc la région d'intérêt : - Faible diamètre de l'électrode. - Implantation précise et possibilité de vérification <i>a posteriori</i> la cellule enregistrée (marquage avec un colorant). • Bonne résolution temporelle puisque les effet des agents pharmacologiques sont quasi immédiats lors de l'administration intraveineuse (de l'ordre de la minute selon les propriétés pharmacocinétiques de l'agent pharmacologique étudié). • Plusieurs souris par jours, résultats immédiats. • Corrélation possible avec le comportement et la neurochimie (la fréquence de décharge pouvant, dans certains cas, prédire l'intensité de libération dans les aires terminales du neurotransmetteur étudié).	• Impossibilité d'en fabriquer « artisanalement ». • Animal anesthésié au cours de l'enregistrement de l'activité électrique des neurones. • L'animal ne peut être utilisé pendant plusieurs jours consécutifs. Chaque animal ne peut être utilisé comme son propre témoin notamment lors de traitements pharmacologiques chroniques. • Les modifications de l'activité électrique des neurones dans les régions somatodendritiques ne reflètent pas forcément ce qui se passe dans les régions terminales.

Tableau 28: Des avantages et inconvénients de la technique d'électrophysiologie

4. Tests comportementaux prédictifs d'une activité de type-antidépresseive d'une molécule chez la Souris

Le test de la nage forcée (FST):

Le test de la nage forcée a été établi par Porsolt en 1977 (Porsolt et al., 1977): c'est un test validé pour prédire l'activité de type-antidépresseive d'une molécule (Petit-Demouliere et al., 2005). Il consiste à placer une souris dans un bocal de 19 cm de diamètre et de 25 cm de profondeur rempli d'eau (à une température de +23-25°C). Une caméra placée au-dessus des béciers permet l'enregistrement du test. Le logiciel X'PERT FST (Bioseb, Vitrolles, France) corréle les informations entre la caméra et le capteur. Après une calibration faite par le même expérimentateur, l'appareil effectue une analyse automatique des enregistrements (**Figure 23**).

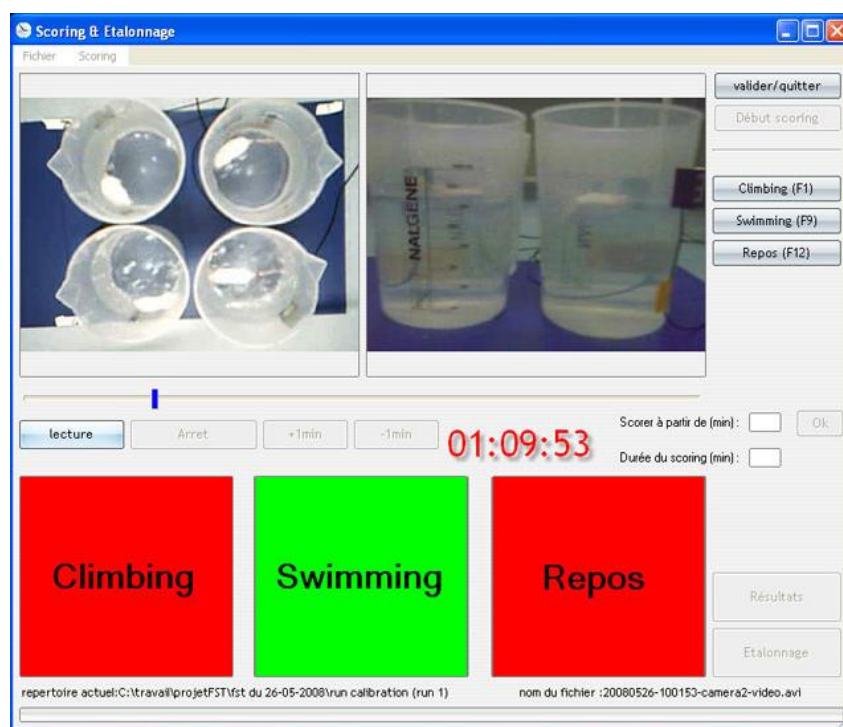


Figure 23 : Test de la nage forcée chez la Souris

Le test dure 6 minutes et consiste à comptabiliser le temps d'immobilité des animaux sur les 4 dernières minutes de test. Après une période de nage d'échappement, l'animal s'immobilise et adopte un comportement dit de « désespoir ». Les souris ayant reçu une dose

unique d'un antidépresseur (administré 30 min avant le test) ont classiquement un temps d'immobilité réduit (ou un temps de mobilité augmenté !) en comparaison des souris contrôles non traitées. Le temps de mobilité d'animal comprend le temps de nage (*un indice de l'activation du système sérotoninergique*) et le temps d'escalade (*un indice de l'activation du système noradrénergique*) (Dulawa et al., 2004, Holick et al., 2008). Dans le FST chez la souris, il existe une très bonne corrélation entre l'activité de type antidépressive prédite pour une molécule et son effet avéré en clinique puisque 94% des molécules, dont le test montre une baisse du temps d'immobilité chez l'animal, se sont révélées être de futurs antidépresseurs en clinique. Ce chiffre n'est que de 89% pour le FST chez le Rat. Cette corrélation dans le FST entre l'effet de type antidépresseur et l'effet thérapeutique chez l'Homme n'est retrouvé dans aucun autre test de comportement chez l'animal (Thiebot et al., 1992).

5. Mesure *ex vivo* de l'activité de recapture des monoamines sur des synaptosomes

5.1. Principe

Le principe de cette méthode consiste à étudier la recapture de monoamines radiomarquées sur des homogénats de cerveau. Cette technique s'effectue en présence de différents bloqueurs des transporteurs des monoamines afin d'identifier le(s)quel(s) sont impliqués dans le mécanisme de recapture de la 5-HT ou de la NA.

La première étape consiste à homogénéiser les tissus du cortex frontal afin d'isoler les terminaisons nerveuses. Chacun des synaptosomes présente un diamètre d'environ 0,5 à 1 μm et contient des centaines de vésicules synaptiques fonctionnelles pendant plusieurs heures. Sur ces préparations, des radioligands ($[^3\text{H}]5\text{-HT}$ ou $[^3\text{H}]NA$) sont ajoutés afin de mesurer l'activité de recapture de la 5-HT sur le transporteur SERT et/ou de la NA sur le transporteur NAT inhibée par des concentrations croissantes d'inhibiteurs de recapture (**Figure 24**).

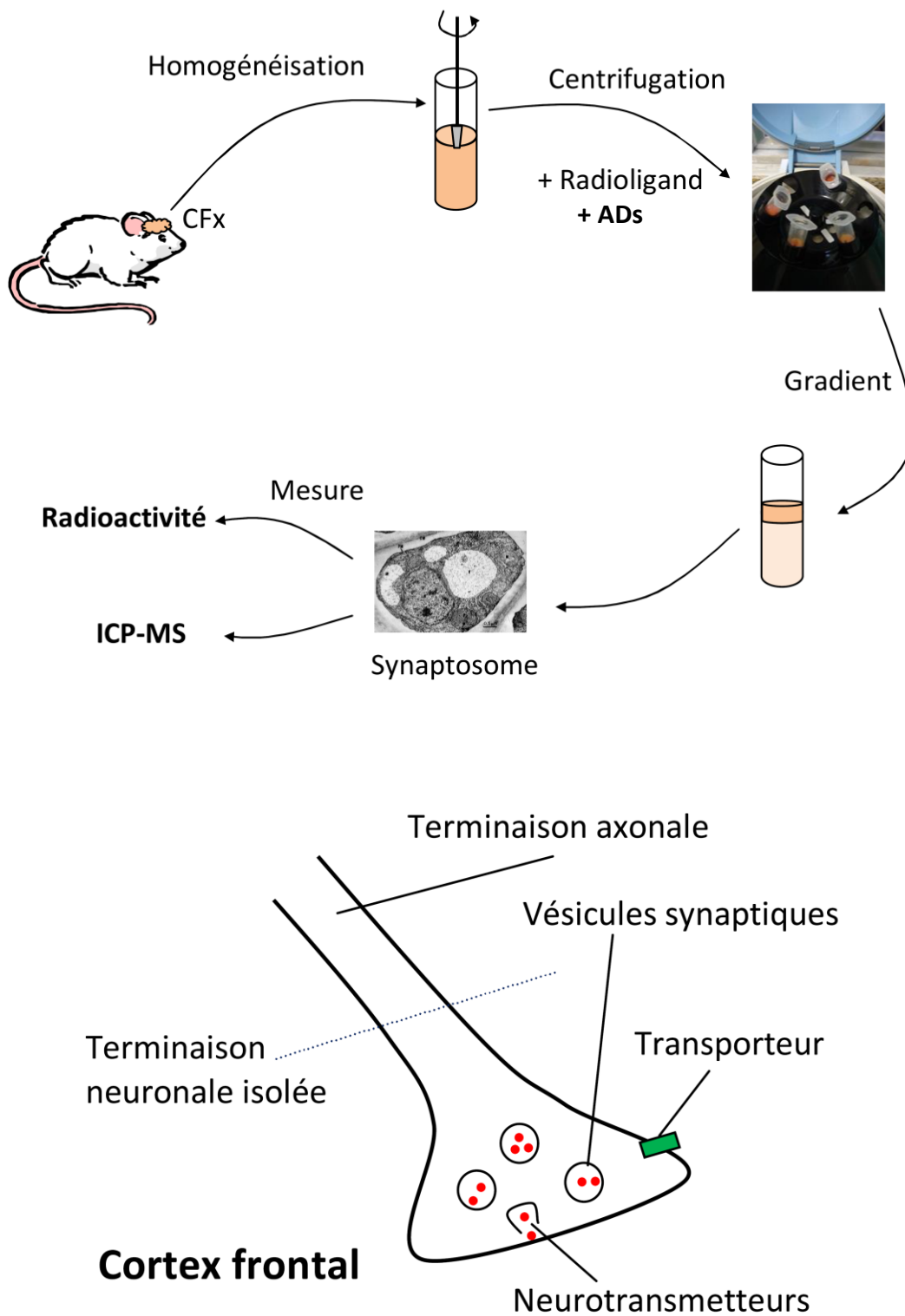


Figure 24 : Schéma représentant un protocole pour mesurer l'activité de recapture des monoamines sur des synaptosomes

5.2. Recapture (ou « uptake ») des monoamines

Après décapitation de souris mâles contrôles dites « sauvages » (Janvier, St Berthevin, France), le cortex frontal est disséqué, puis émincé sur de la glace. Le tissu est ensuite re-suspendu dans 10 volumes de sucrose (0,32 M). Les cellules sont dissociées à travers des filtres de nylon dont la taille des pores diminue (180 à 60 µm, Small Parts, Miramar, FL, USA), puis re-suspendues dans du sucrose. Cette suspension est pré-incubée 10 min à 37 °C dans 3 volumes de tampon KRH (Krebs Ringer Hepes) LiCl (25 mM HEPES–KOH, pH 7.4, 125 mM LiCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D(+)-glucose, 1.2 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄ and 1.2 mM MgSO₄). Afin de favoriser le transport à faible affinité de la 5-HT, les autres transporteurs sont bloqués en préincubant avec 10 µM de venlafaxine (Tocris Bioscience, Bristol, UK), 5 µM de désipramine, 100 µM de GBR12935, ainsi que 10 µM de pargyline et 10 µM de réserpine (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Une incubation de 15 min à +37°C est réalisée en présence de 10 µM de [³H]NA et [³H]5-HT (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). L'effet du escitalopram sur la recapture de faible affinité par les OCT a été évalué en présence de concentrations croissantes de cet antidépresseur (0,1 - 10 mM). La réaction est stoppée par une filtration rapide à travers des filtres Unifilter-96 GF/C (Perkin Elmer), les cellules sont ensuite lavées 4 fois avec 3 volumes de tampon dercapture froid. La radioactivité retenue sur les filtres est comptée grâce au liquide de scintillation ajouté. La concentration en protéine des extraits est mesurée par la méthode de Bradford standardisée avec de la BSA (sérum albumine bovine). La recapture médiée par les transporteurs à faible affinité est évaluée par inhibition avec l'inhibiteur spécifique des OCTs, le decynium 22 (1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide) (500 µM; Sigma-Aldrich). Les données sont exprimées en moyenne ± s.e.m. de la recapture à faible affinité pour une expérience réalisée en triplicate.

Résultats expérimentaux

ARTICLE 1: Caractérisation des souris 5-HT_{1A/1B} -/-: un modèle animal sensible aux traitements anxiolytiques

Jean-Philippe Guilloux, Denis David, Lin Xia, **Hai Thanh Nguyen**, Quentin Rainer, Bruno Guiard, Christelle Repérant, Thierry Deltheil, Miklos Toth, René Hen, Alain M. Gardier
Neuropharmacology 61(3):478-88.

Résumé : Notre recherche consiste à comprendre le mécanisme d'action de molécules à visée anxiolytique/antidépresseive et ceci dans des modèles animaux présentant des modifications comportementales comparables à celles observées chez l'Homme. Ainsi dans ce travail, nous avons créé par croisement un modèle de souris anxieuses présentant une inactivation génétique des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}.

Principaux résultats

- Les souris 5-HT_{1A/1B} -/- présentent une hyper anxiété (non conditionnée) caractérisée dans 3 tests comportementaux : l'Open-field, l'EPM et le NSF. Ce phénotype a été corrigé par une administration aiguë de diazépam (benzodiazépine) ou chronique d'ISRS (paroxétine).

- Les souris 5-HT_{1A/1B} -/- présentent des concentrations extracellulaires basales de 5-HT ([5-HT]_{ext}) augmentées comparées par rapport aux souris 5-HT_{1A/1B} +/+ dans le cortex frontal (CFx) et le noyau du raphé dorsal (NRD) ainsi qu'un moyen de décharge électrique des neurones sérotoninergiques 2 fois plus élevé. L'ensemble de ces résultats suggèrent une dérégulation du système sérotoninergique consécutive à la délétion de ces deux récepteurs, confirmée par une diminution de l'expression de l'ARNm codant pour SERT dans le NRD.

- La délétion des 2 récepteurs chez les souris 5-HT_{1A/1B} -/- a induit une potentialisation de l'augmentation des [5-HT]_{ext} induite par la paroxétine dans le CFx (351±17%) et le NRD (643±95%) par rapport aux souris 5-HT_{1A/1B} +/+ (CFx : 151±9%, NRD : 213±16%), confirmant ainsi les données obtenues à partir d'études pharmacologiques (Dawson et al., 2002).

Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontre que les souris KO 5-HT_{1A/1B} -/- possèdent un phénotype anxieux qui peut être en partie inversé par diverses stratégies thérapeutiques anxiolytiques (administration aiguë de diazépam et administration chronique d'ISRS). Ce comportement est associé à une élévation des [5-HT]_{ext} dans le CFx et le NRD et une augmentation de l'activité électrique des neurones 5-HT (c'est premier modèle animal qui associe ces deux propriétés). Cette étude confirme ainsi l'hypothèse selon laquelle l'anxiété serait en partie liée à une hyperactivité du système sérotoninergique. **Toutefois, une délétion constitutive des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} n'a pas permis de dissocier le rôle des autorécepteurs de celui des hétérorécepteurs post-synaptiques.**



Contents lists available at ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Characterization of 5-HT_{1A/1B}–/– mice: An animal model sensitive to anxiolytic treatments

Jean-Philippe Guilloux^{a,*}, Denis J.P. David^a, Lin Xia^a, Hai Thanh Nguyen^a, Quentin Rainer^a, Bruno P. Guiard^a, Christelle Repérant^a, Thierry Deltheil^a, Miklos Toth^b, René Hen^c, Alain M. Gardier^{a,*}

^a Univ Paris-Sud EA 3544, Faculté de Pharmacie, 5, rue JB Clément, Châtenay-Malabry Cedex F-92296, France

^b Department of Pharmacology, Weill Medical College of Cornell University, 1300 York Avenue, New York, NY 10065, USA

^c Center for Neurobiology and Behavior, Columbia University, New York, NY 10032, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 September 2010

Received in revised form

7 February 2011

Accepted 9 February 2011

Keywords:

5-HT_{1A} receptor

5-HT_{1B} receptor

KO mice

Anxiety

SSRI

Paroxetine

Anxiety

Depression

Electrophysiology

Neurochemistry

Behavior

ABSTRACT

Selective serotonin (5-HT) re-uptake inhibitors (SSRIs) are commonly used in the treatment of generalized anxiety disorder in Humans. However, because only few animal models display overt anxious-like behavior, detailed preclinical studies of the anxiolytic properties of antidepressants are still lacking. Here, we studied the neurochemical and behavioral effects of a double 5-HT_{1A/1B} receptor knockout in mice (5-HT_{1A/1B}–/–) as compared to their wild-type littermates (5-HT_{1A/1B}+/+). It is known that single deletion of either 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor induces behavioral changes that are not correlated with differences in brain serotonergic tone. Deletion of both receptors resulted in (i) higher emotionality of animals, as observed in three unconditioned paradigms of anxiety (open field, elevated plus maze and novelty suppressed feeding tests); (ii) a ≈200% increase in the mean spontaneous firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus (DRN) compared to 5-HT_{1A/1B}+/+ mice; (iii) elevated basal dialysate levels of 5-HT in the DRN and frontal cortex; (iv) an exaggerated response to acute paroxetine administration in microdialysis experiments, and (v) increased basal core body temperature. These findings suggest that the deletion of both autoreceptors induces a strong anxious-like behavioral state associated with increased 5-HT neurotransmission. Interestingly, 5-HT_{1A/1B}–/– mice are still sensitive to the acute administration of diazepam. Moreover, while deletion of both receptors impacted on the response to acute SSRI treatment in the forced swim test, anxiolytic-like effects of a chronic SSRI treatment were still observed in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Thus, the 5-HT_{1A/1B}–/– mouse model could be of great interest to unveil the mechanisms of action of the anxiolytic effects of SSRIs.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

General anxiety disorders are best treated with benzodiazepines, but these drugs induce several side effects such as dependency after chronic administration (Lader, 1994). Serotonin-selective reuptake inhibitors (SSRIs) antidepressants, as well as the serotonin–noradrenaline reuptake inhibitor venlafaxine, are also effective in the treatment of general anxiety disorders (Ball et al., 2005; Bielski et al., 2005; Rickels et al., 2003; Stein et al., 2005). However, compared to benzodiazepines, the decrease in side effects of SSRI is counterbalanced by their slower onset of therapeutic action (Klein et al., 1995; Rickels et al., 2003).

The anxiolytic properties of SSRIs are difficult to demonstrate in preclinical studies, because current animal models of anxiety are

poorly predictive (Borsini et al., 2002). The generation of knockout (KO) mice has however showed promise in this regard. For example, 5-HT_{1A} receptor KO mice (5-HT_{1A}–/–) display an anxious phenotype (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998), associated with decreased exploratory activity, increased fear of aversive environments (Klemenhagen et al., 2006) and other aspects of anxiety, such as autonomic activation, increased stress responsiveness, and neuroendocrine abnormalities (see Toth, 2003 for a review). Moreover, increased 5-HT turnover (Ase et al., 2000) and increased 5-HT neuron firing (Richer et al., 2002) have been reported in 5-HT_{1A}–/– mice, even though not associated with increased basal extracellular 5-HT levels ([5-HT]ext), as measured by microdialysis in the striatum (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001b), dorsal raphe nucleus (DRN) and frontal cortex (Bortolozzi et al., 2004; Guilloux et al., 2006). Moreover, acute treatment with an SSRI, which increases [5-HT]ext levels in the DRN and frontal cortex of both 5-HT_{1A}–/– and 5-HT_{1A}+/+ mice (Guilloux et al., 2006), has a greater effect on the forced swim test

* Corresponding authors. Tel.: +33 1 46 83 54 16; fax: +33 1 46 83 53 55.

E-mail addresses: jean-philippe.guilloux@u-psud.fr (J.-P. Guilloux), alain.gardier@u-psud.fr (A.M. Gardier).

in the 5-HT_{1A} KO mice, whereas chronic SSRI treatment does not seem to affect the anxiety phenotype of these mice (Santarelli et al., 2003).

5-HT_{1B}–/– mice do not display overt anxiety (Sari, 2004), but enhanced aggressiveness (Brunner and Hen, 1997; Ramboz et al., 1996; Sari, 2004; Saudou et al., 1994), an abnormality which correlates with brain 5-HT dysfunction (Siever, 2008). Even though axon terminal release of 5-HT is under the control of 5-HT_{1B} autoreceptors (Chaput et al., 1986), changes in 5-HT dynamics are not prominent in the brain of 5-HT_{1B}–/– mice (Ase et al., 2000, 2001). Nor do these mice show any significant increase in 5-HT neuron firing (Evrard et al., 1999). Accordingly, their basal [5-HT]_{ext} levels appear to be unaffected in 5-HT terminal areas (De Groote et al., 2002b; Gardier et al., 2003; Knobelmann et al., 2001b; Malagie et al., 2001; Trillat et al., 1997). However, by comparison to wild-type mice, acute SSRI treatment produces a greater [5-HT]_{ext} increase in the hippocampus and frontal cortex of 5-HT_{1B}–/– mice (De Groote et al., 2002a,b; Malagie et al., 2001, 2002), even if this treatment has no effect in the forced swim test (Gardier et al., 2001).

Very few studies have been aimed at characterizing the effects of a disruption of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. 5-HT_{1A/1B}–/– mice have been generated previously to evaluate the binding ability of the 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, to 5-HT₇ receptors (Bonaventure et al., 2002) and the impact of this double deletion on sleep-wakefulness rhythms (Alexandre et al., 2004). However, a behavioral, neurochemical and electrophysiological characterization of these mice is still lacking.

In this context, we hypothesized that a mouse lacking both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors might represent an interesting animal model to test for anxiolytic-like activity of SSRIs. We thus generated double KO mice (5-HT_{1A/1B}–/–), measured the effects of the double mutation on [5-HT]_{ext} in the DRN and frontal cortex of these mice, and correlated such measurements with behavioral responsiveness to either acute or chronic SSRI antidepressant treatment. Our results provide the first demonstration that 5-HT_{1A/1B}–/– mice display an anxiety-like phenotype associated with an increased basal firing rate of DRN 5-HT neurons with increased basal [5-HT]_{ext} in both the DRN and frontal cortex, as well as a reversion of this anxious phenotype by chronic SSRI treatment.

2. Methods

2.1. Animals

5-HT_{1A} receptor KO mice (5-HT_{1A}–/–) generated by Parks et al. (Parks et al., 1998) on the C57BL/6 background were crossed with homozygous 5-HT_{1B} receptor KO mice (5-HT_{1B}–/–) generated by Saudou et al. (1994) on the 129 Sv background. These F1 heterozygous 5-HT_{1A/+} and 5-HT_{1B/+} mice were then bred to generate double 5-HT_{1A/1B}–/– mice F2 and their wild-type littermates (5-HT_{1A/1B}+/+ control mice). All the animals were genotyped by PCR (Supplementary Materials and Supplementary Fig. 1). Male animals F3 (6–8 weeks old) weighing 25–30 g were used. Procedures involving animals and their care were conducted in conformity with the institutional guidelines, in compliance with international laws and policies (Council directive # 87-848, October 19, 1987, "Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale", permissions # 92-196 to AM.G).

2.2. Chemicals and drugs

Paroxetine hydrochloride, a gift from GlaxoSmithKline laboratory (Harlow, United Kingdom), was dissolved in NaCl 0.9% for acute administration (4 or 8 mg/kg intraperitoneally, i.p.) or in tap water for chronic administration (16 mg/kg/day for 4 weeks). Despite its relative lower selectivity for serotonin reuptake transporter, paroxetine displays greater affinity (Owens et al., 2001) and potency for this transporter than other SSRIs (Mochizuki et al., 2002). Paroxetine doses were chosen according to the literature showing that low doses are sufficient to induce acute effects in the elevated plus maze or in the forced swim test (David et al., 2003b; Koks et al., 1999), whereas higher doses need to be used for chronic treatment (Elizalde et al., 2008). Diazepam (1 mg/kg, i.p.; Sigma–Aldrich, Saint Quentin Fallavier,

France) was dissolved in Tween 20%. Control animals were injected with the corresponding vehicle.

2.3. Behavior of 5-HT_{1A/1B}–/– mice

2.3.1. The open field paradigm

Anxiety and locomotor activity of mice were measured using the open field test (David et al., 2009). Each animal was placed in a 43 × 43 cm open field chamber, and tested for 30 min. Mice were monitored throughout each test session by an infrared tracking system (Med Associates, USA: (Rocha et al., 1998)). Dependent measures in the center were the total time and the number of entries over a 30-min period of test. The overall motor activity was quantified as the total distance travelled.

2.3.2. The elevated plus maze test

Each mouse was allowed to explore the apparatus for 5 min. Global activity was assessed by measuring the number of entries into the four arms (David et al., 2009). Anxiety was assessed by comparing the activity in the open versus enclosed arms.

2.3.3. The novelty suppressed feeding test

The novelty suppressed feeding paradigm (NSF) is a conflict test that elicits competing motivations between the drive to eat and the fear of venturing into the center of brightly lit arena. Latency to begin eating is used as an index of anxiety-like behavior, because classical anxiolytic drugs decrease this measure as well as chronic SSRI treatment (David et al., 2009). Mice were food-deprived for 24 h prior to the test. Testing was performed in a 50 × 50 cm box covered with bedding, and illuminated by a 70-Watts lamp. The latency to eat pellets of food placed in the center of the box, on the top of a piece of white filter paper, was timed. Each mouse was tested individually for 5 min.

2.3.4. The mouse forced swim test

In the forced swim test, mice were dropped individually into glass cylinders (height: 25 cm, diameter: 10 cm) containing 10 cm water height, maintained at 23–25 °C. Animals were tested for a total of 6 min. For acute administration of treatments, vehicle or paroxetine (8 mg/kg) were administered 30 min before the test. Two mice were tested simultaneously, and the time of mobility was recorded during the last 4 min of the 6-min testing period, after 2 min of habituation. The same well-trained experimenter, who was unaware of the treatment administered, performed the test.

2.4. Basal temperature measurement and stress induced hyperthermia (SIH)

Stress exposure induce several autonomic responses, including hyperthermia. The SIH test is based on this phenomenon and consists of a simple experimental procedure, in which the body temperature of mouse is measured twice via a rectal procedure, with an interval of 10 min. The procedure of the rectal temperature measurement (handling, insertion of the probe) is the actual stressor in this test (Olivier et al., 2003; Van der Heyden et al., 1997). After dipping in oil silicon, 2 cm of a thermistor probe was inserted in the rectum of mice to monitor body temperature using a BIO-TK9882 thermometer (BIOSEB, Vitrolles, France; accuracy of ±0.1 °C) (Trillat et al., 1998b). Experiments were performed at 10:00 AM. Digital recordings of basal rectal temperature (T₀) were obtained, and then body temperature was again measured 10 min (T₁₀) after the first measurement (that serves as a stressor). The stress-induced hyperthermia was calculated as the difference between these two temperatures ($\Delta T = T_{10} - T_0$).

2.5. Microdialysis procedure

Anaesthetized mice were implanted with probes located in the frontal cortex (stereotaxic coordinates in mm from bregma: A = +1.6, L = +1.3, V = –1.6) or in the DRN (A = –4.5, L = 0, V = –4.0; A, anterior; L, lateral; and V, ventral). Animals were allowed to recover from the surgery overnight. The next day, ≈ 20 h after surgery, the probes were continuously perfused with an artificial cerebrospinal fluid (flow rate = 1.5 µl/min in cortex, 0.5 µl/min in DRN) while animals were awake, freely moving in their cage. Dialysate samples were analyzed for [5-HT]_{ext} by a HPLC apparatus (limit of sensitivity ≈ 0.5 fmol/sample; signal-to-noise ratio = 2). Four fractions were collected to obtain basal values (means ± S.E.M.) before drug administration (Guiard et al., 2007; Guilloux et al., 2006). At the end of the experiments, localization of microdialysis probes was verified histologically (Bert et al., 2004).

2.6. In vivo electrophysiological recordings

Anaesthetized mice were placed into a stereotaxic frame. The extracellular recordings of the 5-HT neurons in the dorsal raphe were carried out as previously described (Guiard et al., 2008). The single-barreled glass micropipettes were positioned using the following coordinates (in mm from lambda): AP, –0.5 to 1; L, 0 ± 0.1; V, 2.5 to 3.5. Presumed 5-HT neurons were identified by their characteristic slow, regular firing rate (0.5–2.5 Hz) and long duration action potential (2–5 ms)

(Aghajanian and Vandermaelen, 1982). Electrophysiological data were expressed as mean $\pm$ S.E.M of the firing rate. The number of spontaneously active 5-HT neurons was also determined in each experimental group and data were expressed as mean $\pm$ S.E.M of neurons recorded per tract.

2.7. RNA isolation and SERT expression

Coronal brain slices were performed using a Brain matrix, and dorsal raphe nuclei were separated under the microscope from the rest of the tissue and directly put in TRIzol (Invitrogen®, USA). Total RNA from raphe nuclei was extracted from brain sections in TRIzol and assessed by chromatography (Agilent Bioanalyzer, Santa Clara, USA). Samples with an expert scoring number (RIN) above 7.2 were considered of good quality. 2 μ g of RNA were then reverse-transcribed with Anchored-Oligo(dT)₁₈ primers (Deltail et al., 2008). Small PCR products (80–200 base-pairs) PCR products were amplified in triplicates using a LightCycler® Carousel-Based System (Roche, Mannheim, Germany) and SYBR Green PCR Master Mix Reagent (LightCycler® RNA Amplification Kit SYBR Green, Roche). Primer-dimers were assessed by amplifying primers without cDNA. Primers were retained if they produced no primer-dimers or non-specific signal after 35 cycles. Results were calculated as relative intensity compared to β -actin, and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method with the tested primers was used to calculate the relative expression levels of the transcripts (Schmittgen and Livak, 2008).

2.8. Data analysis and statistics

For all experiments, statistical data analysis (StatView 5.0 Abacus Concepts, Berkeley, CA, U.S.A) used means $\pm$ S.E.M. Student *t*-tests, one- or two-way ANOVA (on repeated measures for body temperature) were used followed by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test. Significant level was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Behavioral phenotyping of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice and their response to chronic paroxetine treatment

3.1.1. Open field test

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the number of entries in the center zone and the time spent in the center revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 5.96$; $p < 0.05$], treatment factor [$F(1,47) = 9.38$; $p < 0.01$] and treatment $\times$ genotype interaction between these two factors [$F(1,47) = 5.38$; $p < 0.05$] (Fig. 1A). Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the time spent in the center revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 25.21$; $p < 0.001$], no significant effect of treatment factor [$F(1,47) = 0.064$; $p = 0.80$] and no treatment $\times$ genotype interaction [$F(1,47) = 0.65$; $p = 0.42$] (Fig. 1B). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a basal anxious-like phenotype characterized by a decrease in the number of entries and the time spent in the center compared to control mice ($p < 0.001$). Chronic treatment with paroxetine reversed this phenotype in part: it increased the number of entries in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.01$) and flattened the baseline difference observed between mutant and control mice ($p = 0.95$). This treatment induced a 4-fold increase in the time spent in the center in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice but this effect failed to reach statistical significance.

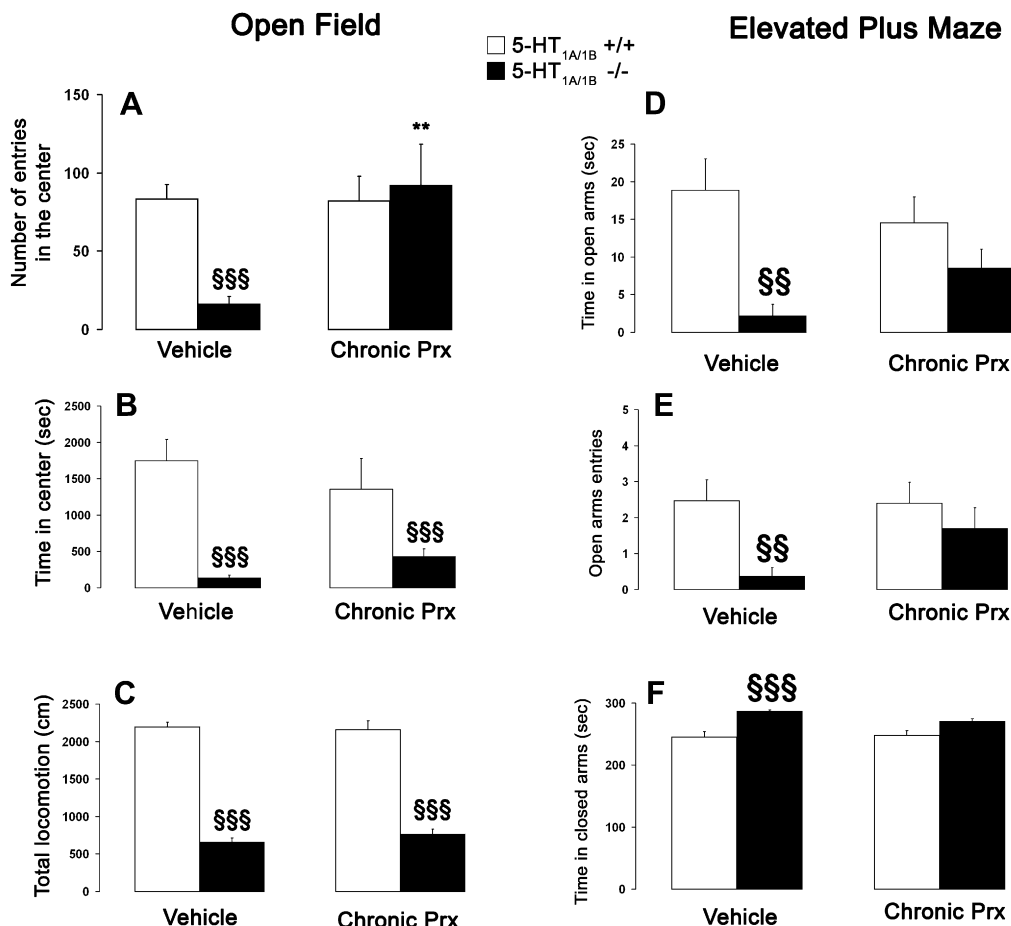


Fig. 1. Effects of chronic paroxetine on 5-HT_{1A/1B}^{-/-} and 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice behavior in the open field (A, B, C) and in the elevated plus maze (D, E, F). Results are expressed as means $\pm$ SEM of parameters measured in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars): Left panel: Open field: number of entries in the zone of the center (Fig. 1A), time spent in the center (in seconds, Fig. 1B), and total locomotor activity (Fig. 1C); Right panel: Elevated plus maze: time spent in the open arms (in seconds, Fig. 1D), number of entries in the open arms (Fig. 1E), and time spent in the closed arms (in seconds, Fig. 1F). ** $p < 0.01$ significantly different from corresponding vehicle group; § $p < 0.01$, §§ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test, $n = 11$ –14 animals per genotype and per treatment.

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the total ambulatory distance revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,47) = 48.08$; $p < 0.001$], no significant main effect of treatment factor [$F(1,47) = 0.07$; $p = 0.79$] and no treatment $\times$ genotype interaction [$F(1,47) = 0.06$; $p = 0.80$] (Fig. 1C). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a 3-fold decrease in basal locomotor activity compared to controls ($p < 0.001$). This decrease in locomotor activity seemed to be driven by the anxious phenotype, since there was no effect of genotype on the home-cage activity during 24 h (Supplementary Fig. S2 and Supplementary Materials).

3.1.2. Elevated plus maze test (EPM)

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the number of entries in the open arms and the time spent in the open arms revealed significant main effects of genotype factor [entries: $F(1,46) = 11.81$; $p < 0.01$ time: $F(1,46) = 17.45$; $p < 0.001$], not of treatment factor [entries: $F(1,46) = 2.19$; $p = 0.15$; time: $F(1,46) = 0.39$; $p = 0.53$], and no treatment $\times$ genotype interaction [entries: $F(1,46) = 0.24$; $p = 0.63$; time: $F(1,46) = 0.71$; $p = 0.40$] (Fig. 1D and E). Thus, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed an anxious-like phenotype manifested by a decrease in the open arms entries ($p < 0.01$) and time spent in the open arms ($p < 0.01$) as compared to controls. No statistical differences between 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and mutant mice were then observed after chronic paroxetine administration (entries: $p = 0.05$; time: $p = 0.08$).

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the time spent in the closed arms revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 21.74$; $p < 0.001$], not of treatment factor [$F(1,46) = 1.47$; $p = 0.23$], and no treatment $\times$ genotype interaction [$F(1,46) = 1.18$; $p = 0.28$] (Fig. 1F). The increase in time spent in the closed arms by untreated 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice compared to their controls ($p < 0.001$) disappeared after chronic paroxetine treatment ($p = 0.05$).

3.1.3. Novelty suppressed feeding test (NSF)

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on latency values revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 8.15$; $p < 0.01$], treatment factor [$F(1,46) = 15.45$; $p < 0.001$], but no treatment $\times$ genotype interaction [$F(1,46) = 0.12$; $p = 0.73$] (Fig. 2A). Untreated 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a majored increase in the latency to feed compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($p < 0.05$). Thus, the anxious phenotype of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice observed in the open field experiment was confirmed in this paradigm. The chronic paroxetine treatment decreased the latency to feed in both 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.05$ for both strains), but a difference between genotypes still occurred following chronic paroxetine treatment ($p < 0.05$).

Neither treatment nor genotype had an effect on food intake measured after the test (genotype [$F(1,46) = 2.62$; $p = 0.12$], treatment [$F(1,46) = 2.34$; $p = 0.13$], treatment $\times$ genotype interaction [$F(1,46) = 0.07$; $p = 0.79$]) (Fig. 2B).

3.2. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice did not respond to acute or chronic paroxetine administration in the mouse forced swim test (FST)

In wild type mice, both acute or chronic paroxetine administration increased mobility time in the FST, as already described (David et al., 2003b). The response to these treatments was different in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice.

3.2.1. Acute administration (Fig. 3A)

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the mobility time revealed significant no effects of genotype factor [$F(1,61) = 0.22$; $p = 0.64$] and treatment factor [$F(1,61) = 1.15$; $p = 0.29$], but an

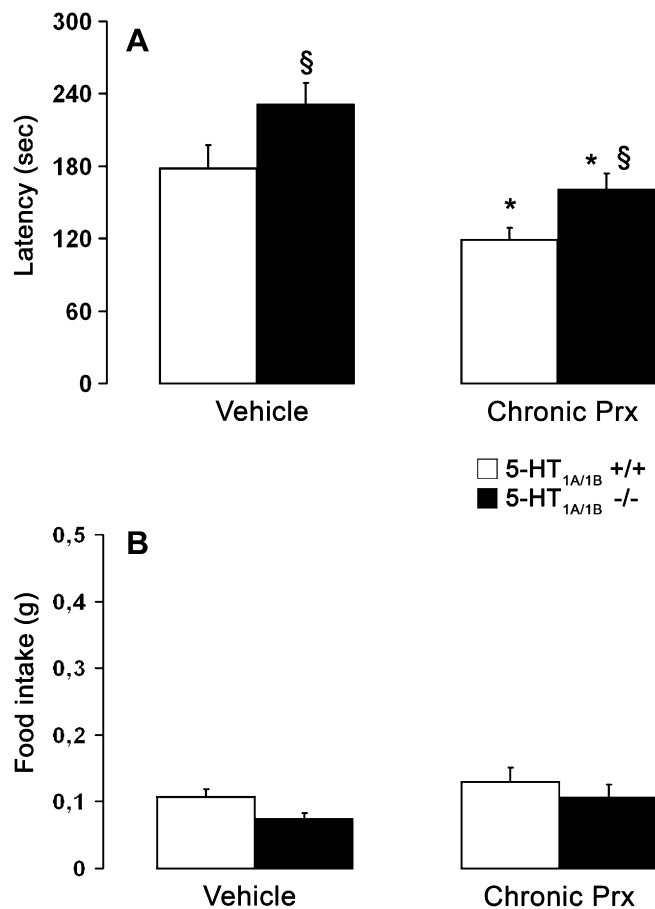


Fig. 2. Effects of chronic paroxetine on 5-HT_{1A/1B}^{-/-} and 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice behavior in the novelty suppressed feeding test. Results are expressed as means $\pm$ SEM of the latency to feed (in seconds, Fig. 2A), and the food intake after the test (in grams) (Fig. 2B) in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). * $p < 0.05$ significantly different from corresponding vehicle group; § $p < 0.05$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD post hoc test, $n = 11$ –14 animals per genotype and per treatment.

interaction between these two factors [$F(1,61) = 27.14$; $p < 0.001$]. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} displayed a change in basal activity i.e., mobility time was increased compared to WT littermates ($p < 0.01$). Acute paroxetine administration (8 mg/kg) increased the mobility time of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} ($p < 0.05$), while it decreased it in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice ($p < 0.001$).

3.2.2. Chronic administration (Fig. 3B)

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on the mobility time revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,46) = 6.88$; $p < 0.05$], not of treatment factor [$F(1,46) = 0.56$; $p = 0.45$], and an interaction between these two factors [$F(1,46) = 12.28$; $p < 0.001$]. Chronic paroxetine administration increased the mobility time in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} ($p < 0.01$) but not ^{-/-} mice ($p = 0.12$). In this second experimental cohort, 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice also displayed an increase in basal activity compared to WT littermates ($p < 0.05$). After 4-weeks of paroxetine administration, there was no difference between genotypes as mobility duration was increased in the 5-HT_{1A/1B}^{+/+} group, without any change in the treated mutants.

3.3. 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice were sensitive to acute administration of diazepam or paroxetine in the elevated plus maze test

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on open arm entries revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,68) = 19.62$;

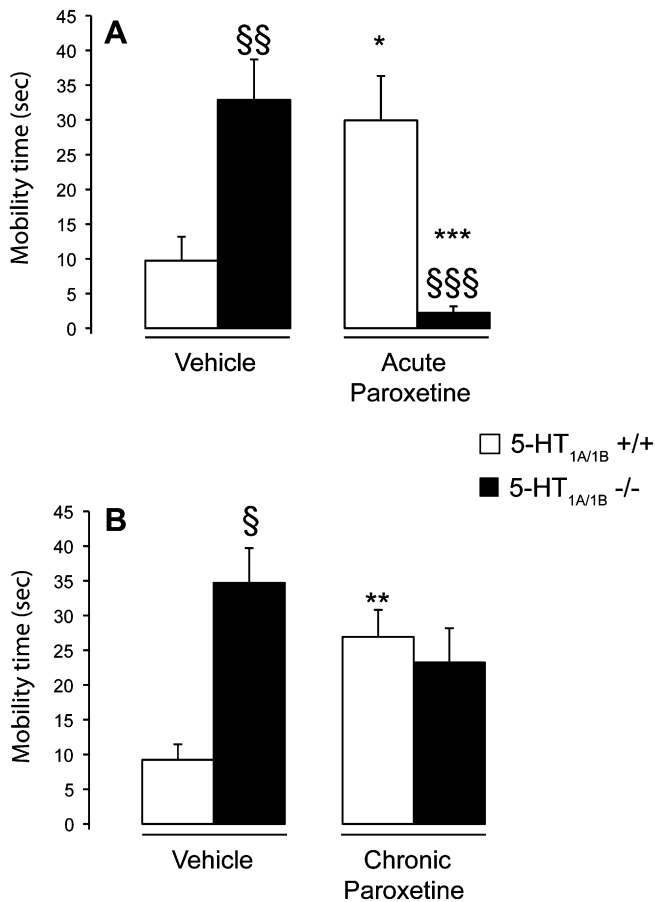


Fig. 3. Effects of acute (A) and chronic paroxetine (B) on the behavior of 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} and ^{+/+} mice in the forced swimming test. Results are expressed as means $\pm$ SEM of the mobility time (in seconds). **Fig. 3A:** 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or acute paroxetine (8 mg/kg, i.p.) 30 min before the test ($n = 13$ –19 animals per genotype and per treatment). **Fig. 3B:** 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or chronic paroxetine (16 mg/kg/day during 28 days) ($n = 12$ –13 animals per genotype and per treatment). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significantly different from the genotype-matched vehicle group; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by PLSD post hoc test.

$p < 0.001$], treatment factor [$F(2,68) = 16.48$; $p < 0.001$] and no treatment $\times$ genotype interaction [$F(2,68) = 1.94$; $p = 0.15$] (Fig. 4A). 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice displayed an elevated anxious basal behavior than 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.001$). In this test, paroxetine had an anxiogenic effect in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.05$), but not in mutants ($p = 0.41$). By contrast, an acute dose of diazepam (1 mg/kg, i.p.) increased the number of entries in open arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.05$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.01$), in keeping with its anxiolytic-like activity.

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on time spent in the open arms revealed significant main effects of genotype [$F(1,67) = 6.56$; $p < 0.05$] and treatment [$F(2,67) = 10.0$; $p < 0.001$], but no treatment $\times$ genotype interaction [$F(2,67) = 2.44$; $p = 0.09$] (Fig. 4B). Thus, 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice displayed more anxious-like basal behavior than their controls ($p < 0.01$). Paroxetine had no effects in 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p = 0.56$), but a significant anxiogenic-like effect in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.05$). By contrast, diazepam increased the time spent in open arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.01$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.05$).

Two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on time spent in the closed arms revealed significant main effects of genotype factor [$F(1,68) = 14.61$; $p < 0.001$], treatment factor [$F(2,68) = 11.77$;

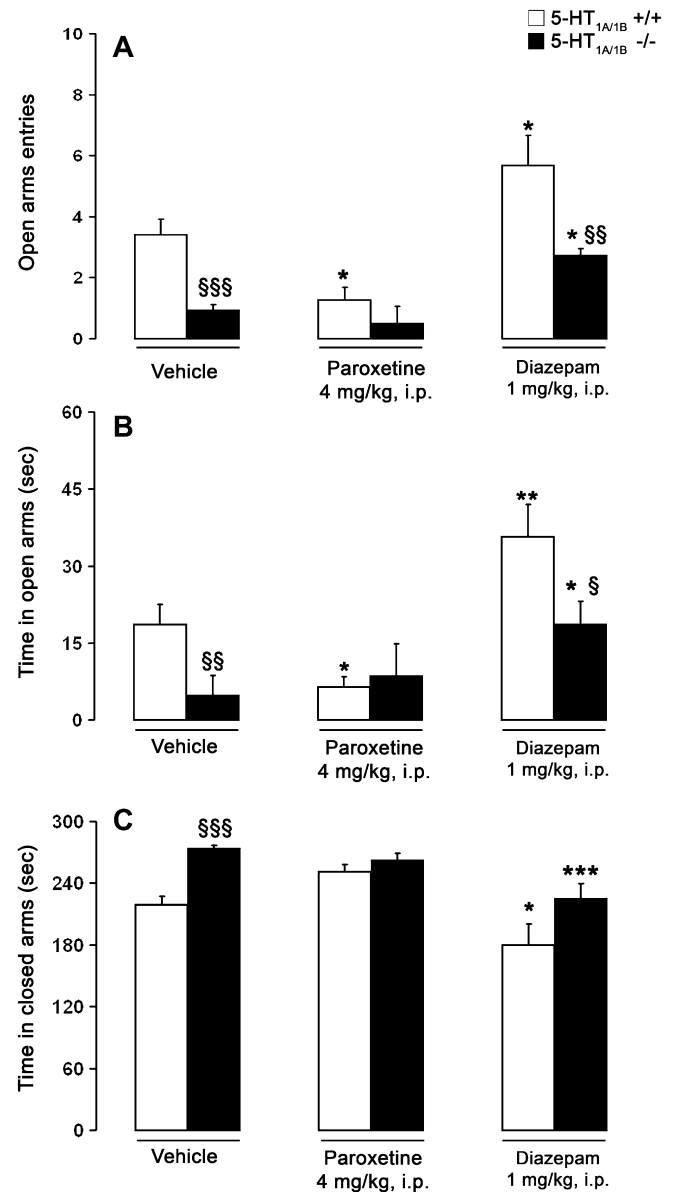


Fig. 4. Effects of the acute administration of diazepam or paroxetine on 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice' behavior in the elevated plus maze test. Results are expressed as means $\pm$ SEM of number of entries in the open arms (Fig. 4A), time spent in the open arms (in seconds, Fig. 4B), and time spent in the closed arms (in seconds, Fig. 4C). 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice (full bars) received either the vehicle or diazepam (1 mg/kg, i.p.) ($n = 10$ –15 mice per group). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ significantly different from the corresponding vehicle group; § $p < 0.05$; §§ $p < 0.01$; §§§ $p < 0.001$ significantly different from 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD post hoc test, $n = 11$ –15 animals per genotype and per treatment.

$p < 0.001$] and no treatment $\times$ genotype interaction [$F(2,68) = 1.88$; $p = 0.16$] (Fig. 4C). 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice spent more time in the closed arms than 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} mice ($p < 0.001$). Paroxetine had no effect in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p = 0.10$ and $p = 0.56$, respectively). Diazepam decreased the time spent in the closed arms in both 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} ($p < 0.05$) and 5-HT_{1A/1B} ^{-/-} mice ($p < 0.001$).

3.4. Behavioral consequences of stress induced hyperthermia in 5-HT_{1A/1B} ^{+/+} and ^{-/-} mice

Two-way ANOVA on repeated measurements showed no effects of genotype [$F(1,40) = 0.62$, $p = 0.44$], but an effect of stress

($F[1,40] = 51.22$, $p < 0.001$) and an interaction between these two factors ($F[1,40] = 21.47$, $p < 0.001$; Fig. 5). At T0, 5-HT_{1A/1B}–/– mice displayed an elevated basal body temperature compared to 5-HT_{1A/1B}+/+ mice ($p < 0.01$). This higher body temperature was confirmed in another set of experiments using another cohort of animals and performed at 2PM (data not shown). Ten minutes later (T10), analysis of ΔT demonstrated that 5-HT_{1A/1B}+/, but not 5-HT_{1A/1B}–/– mice ($p = 0.48$), had an elevated body temperature (+1.1 °C), generated by the stress of inserting the rectal probe at T0 ($p < 0.001$).

3.5. Basal extracellular levels of 5-HT in the frontal cortex and DRN in 5-HT_{1A/1B}+/+ and 5-HT_{1A/1B}–/– mice

Table 1 shows the means $\pm$ S.E.M. of basal [5-HT]_{ext} levels in the frontal cortex (in fmol/20 μ l) and DRN (in fmol/10 μ l) of the various groups of mice studied. Basal [5-HT]_{ext} were significantly increased in both the frontal cortex [$F(1,27) = 14.46$, $p < 0.001$] and DRN [$F(1,40) = 8.54$, $p < 0.01$] in 5-HT_{1A/1B}–/– mice compared to controls.

3.6. Deletion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors potentiated the increase in 5-HT outflows induced by paroxetine administration

In the frontal cortex and DRN (Fig. 6A–D), the lack of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} autoreceptors potentiated the effects of paroxetine on [5-HT]_{ext}: two-way ANOVA (treatment $\times$ genotype) on AUC values revealed significant main effects of genotype factor [frontal cortex: $F(1,25) = 78.84$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 9.04$; $p < 0.01$], treatment factor [frontal cortex: $F(1,25) = 151.68$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 22.53$; $p < 0.001$] and treatment $\times$ genotype interaction [frontal cortex: $F(1,25) = 76.60$; $p < 0.001$. DRN: $F(1,22) = 9.82$; $p < 0.01$]. The acute administration of paroxetine (4 mg/kg, i.p.) increased [5-HT]_{ext} in both regions in 5-HT_{1A/1B}+/+ (frontal cortex: $p < 0.05$. DRN: $p < 0.001$) and 5-HT_{1A/1B}–/– mice (frontal cortex: $p < 0.01$. DRN: $p < 0.001$), but this effect was much stronger in 5-HT_{1A/1B}–/– than in 5-HT_{1A/1B}+/+ mice (frontal cortex: $p < 0.001$. DRN: $p < 0.01$). After chronic paroxetine treatment, the paroxetine challenge produced a significant increase

Table 1

Basal extracellular 5-HT levels in the frontal cortex (FCX) and Dorsal Raphe Nucleus (DRN) in 5-HT_{1A/1B}+/+ and 5-HT_{1A/1B}–/– mice.

	5-HT _{1A/1B} +/+ mice	5-HT _{1A/1B} –/– mice
FCX (fmol/20 μ l)	2.41 (± 0.16 ; $n = 13$)	3.41 (± 0.11 ; $n = 16$)
DRN (fmol/10 μ l)	13.50 (± 0.88 ; $n = 15$)	19.64 (± 1.80 ; $n = 27$)

Results are expressed as means of basal 5-HT levels ($\pm$ SEM, $n = \#$ of mice).

in cortical [5-HT]_{ext} in 5-HT_{1A/1B}+/+ mice compared to the vehicle-treated group (AUC = $204 \pm 10.5\%$; $p < 0.001$) (insert, Fig. 6B).

3.7. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletions in mice on basal firing rate in the dorsal raphe nucleus (DRN)

A student *t*-test on the firing rate of DRN 5-HT neurons indicated that the mean spontaneous firing rate of these neurons was significantly higher in 5-HT_{1A/1B}–/– mice than in controls (2.4 ± 0.1 Hz vs. 1.2 ± 0.1 Hz, respectively; $p < 0.001$, Fig. 7A and B). Interestingly, the mean number of DRN 5-HT neurons recorded per track was also significantly higher in 5-HT_{1A/1B}–/– mice than in controls (Fig. 7C, $n = 15$ tracks per genotype; $p < 0.001$).

3.8. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletion in mice on SERT expression in the raphe nuclei

qPCR analysis of SERT expression in the DRN shown a 28% decrease in SERT mRNA levels in 5-HT_{1A/1B}–/– mice when compared to 5-HT_{1A/1B}+/+ mice (Fig. 8; $F(1,24) = 13.88$, $p < 0.001$).

4. Discussion

This neurochemical and behavioral characterization of a mouse line knock-out for both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor genes complements the few studies performed in similar models (Alexandre et al., 2004; Bonaventure et al., 2002). 5-HT_{1A/1B}–/– mice display a robust, “hyper-anxious” phenotype associated with (i) increased basal firing rate of DRN 5-HT neurons; (ii) increased basal [5-HT]_{ext} levels in both the DRN and frontal cortex; (iii) increased basal body temperature, and (iv) an increased reactivity to stress induced by the FST. This “hyper-anxious” phenotype is corrected in part by either acute diazepam or chronic SSRI administration.

4.1. 5-HT_{1A/1B}–/– mice basal phenotype

The anxious-like basal phenotype of the double KO mice appears to be driven mainly by the lack of the 5-HT_{1A} rather than that of 5-HT_{1B} receptors. Indeed, there is convincing evidence that 5-HT_{1A}–/– mice may represent a “genetic model of anxiety” (Toth, 2003), while studies performed in 5-HT_{1B}–/– mice suggest that these exhibit similar or less anxious-like behavior than controls (Brunner et al., 1999; Crabbe et al., 1999; Lopez-Rubalcava et al., 2000; Malleret et al., 1999). Furthermore, 5-HT_{1B} receptor antagonists display anxiolytic-like properties (Dawson et al., 2006). The hypolocomotion of the double mutants in the open field may well be associated with their anxious phenotype as both anxious-like behavior and hypolocomotion share similar neural pathways or genes (Yilmazer-Hanke, 2008) and co-occur in this test (Holmes et al., 2002). Indeed, 24-hours home cage activity measurement indicated that 5-HT_{1A/1B}–/– mice display as much locomotion as their wild-type littermates. 5-HT_{1A}–/– mice also display similar activity compared to their littermates, while 5-HT_{1B}–/– mice display similar or increased total activity, as observed in the open

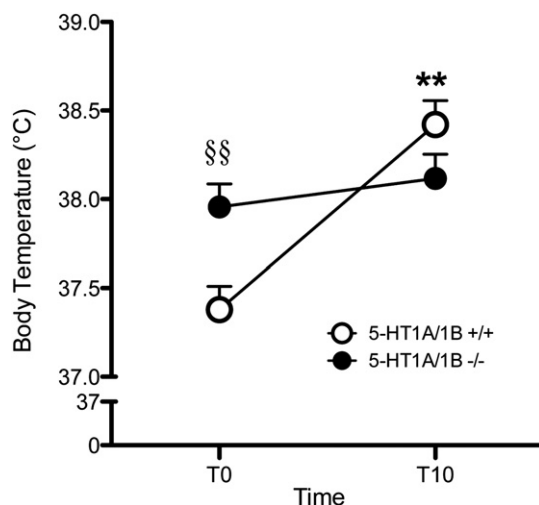


Fig. 5. Behavioral consequences of stress induced hyperthermia in 5-HT_{1A/1B}+/+ and –/– mice. Results are expressed as means $\pm$ SEM of rectal temperature in 5-HT_{1A/1B}+/+ (○) and 5-HT_{1A/1B}–/– mice (●) measured at two different times (T=0 and T=10 min). ** $p < 0.01$ significantly different from the T0; §§ $p < 0.01$ significantly different from 5-HT_{1A/1B}+/+ mice. Two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test, $n = 20$ –22 animals per genotype.

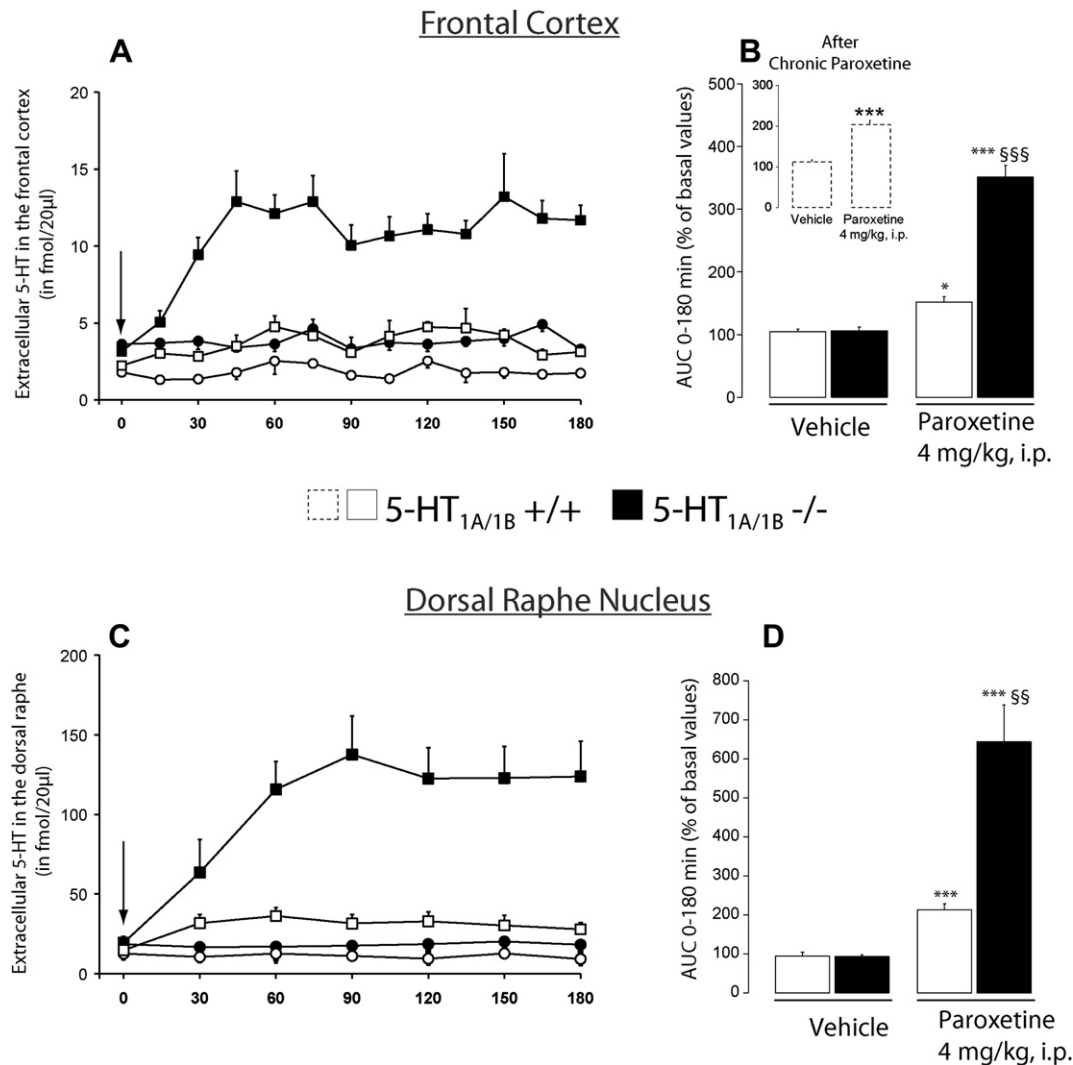


Fig. 6. Effects of acute paroxetine administration on cortical (A, B) or DRN [5-HT]_{ext} levels (C, D) in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. In A and C, results are expressed as means $\pm$ SEM of [5-HT]_{ext} (in fmol per 20 μ l) for the frontal cortex and DRN, respectively. 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty symbols) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full symbols; $n = 6-10$ mice per group) were administered either the vehicle ($\circ, \bullet$) or paroxetine (4 mg/kg, i.p.) ($\square, \blacksquare$) at arrow. In B and D, data are expressed as area under the curve values (AUC; mean $\pm$ SEM; $n = 5-8$ animals/genotype), i.e., relative amount of 5-HT outflow following the administration of either vehicle or paroxetine in percentage of baseline. The insert in 6A (dotted bars) shows the significant increase in [5-HT]_{ext} measured in the frontal cortex after the administration of an acute dose of paroxetine in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice chronically treated with paroxetine. $p < 0.05$ and *** $p < 0.001$, significantly different from the corresponding vehicle-treated group; §§ $p < 0.01$ and §§§ $p < 0.001$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. One-way or two-way ANOVA followed by a PLSD *post hoc* test.

field paradigm (Crabbe et al., 1999; Malleret et al., 1999; Saudou et al., 1994; Searce-Levie et al., 1999; Zhuang et al., 1999).

This hyper-anxious state was also reflected in the FST, as 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice displayed a robust basal increase in mobility, an effect also observed in single 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Guilloux et al., 2006; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1996), but not in 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Trillat et al., 1998a). This suggests that the genetic inactivation of 5-HT_{1A} receptors enhanced the response of double mutant mice to stressful conditions, an effect that is not modified by inactivation of 5-HT_{1B} receptors.

Using neurochemical techniques, we tried to link the anxious-like phenotype of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice to changes in variation in serotonin neurotransmission. We found that the anxiogenic phenotype of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice correlated with a 40% increase in serotonergic tone in both the frontal cortex and DRN. Comparatively, a single mutation did not change basal frontocortical [5-HT]_{ext}, neither in single 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Guilloux et al., 2006; Knobelmann et al., 2001b), nor in single 5-HT_{1B}^{-/-} mice (De Groote et al., 2002a; Gardier et al., 2003; Malagie et al., 2001).

These results suggest a lack of tonic control exerted by these autoreceptors on basal 5-HT release and that, in the single mutants, compensatory changes in the remaining autoreceptor subtype or other secondary developmental adaptations compensate for the absence of the missing autoreceptor.

Similarly, in pharmacological experiments, the co-perfusion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor antagonists in the raphe nuclei of rats has been shown to increase the local efflux of 5-HT, as measured by fast cyclic voltammetry, while no effects were observed when the antagonists were perfused separately (Roberts and Price, 2001), suggesting a synergistic effect of the blockade of both receptors on serotonergic tone. Conversely, it would seem that compensatory changes observed in terminal brain regions of 5-HT neurons in either 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Knobelmann et al., 2001a; Ramboz et al., 1998) or 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Knobelmann et al., 2001a; Shippenberg et al., 2000) may not be sufficient to dampen the increase in activity of these neurons.

Our electrophysiological results were consistent with the microdialysis data. Indeed, the mean spontaneous firing rate of

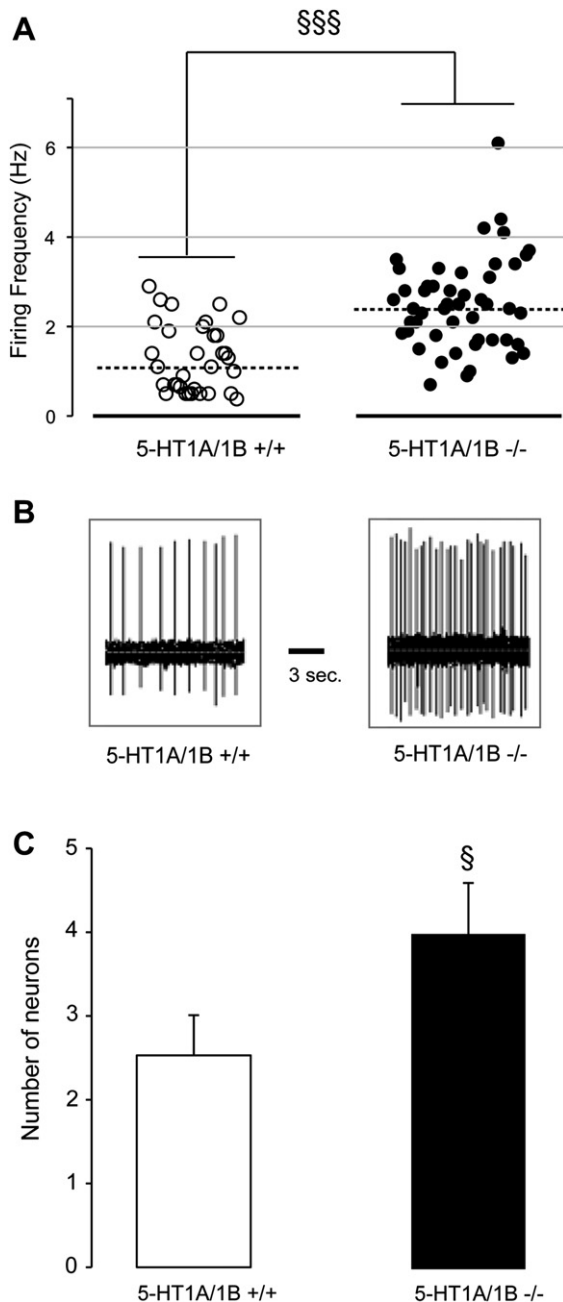


Fig. 7. Influence of 5-HT_{1A/1B} receptors deletion on the firing rate of DRN serotonin neurons. (A) Scattergram depicting the firing frequency of 5-HT neurons in the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. Dotted line represents the median value. (B) Examples of typical recordings of DR 5-HT neurons from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice. (C) Mean $\pm$ SEM for the number of 5-HT neurons recorded per track in the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). § $p < 0.05$ and §§§ $p < 0.001$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($n = 6–8$ animals per genotype).

5-HT neurons was doubled in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, with 65% of 5-HT neurons still firing in the range measured in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, as also observed in 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Richer et al., 2002). Thus, the deletion of the 5-HT_{1B} receptor did not amplify the consequences of the deletion of the 5-HT_{1A} receptor on the firing rate of DRN 5-HT neurons. The alterations in 5-HT neurotransmission could also be related to changes in the activity or density of the 5-HT reuptake transporter. Indeed, a 28% decrease in SERT mRNA expression was measured in the DRN in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, which should decrease 5-HT clearance and might thus be responsible for increased basal

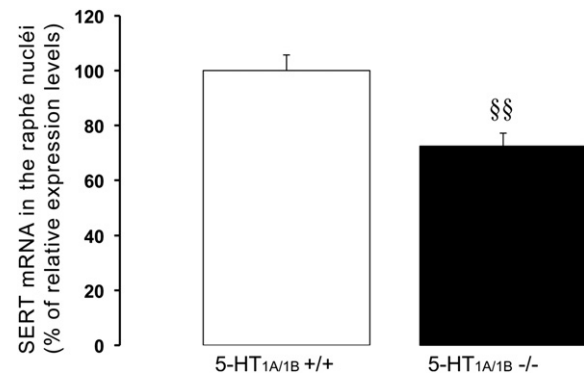


Fig. 8. Influence of 5-HT_{1A/1B} deletion on SERT expression in the dorsal raphe nuclei (DRN). Data are expressed as percentage of relative expression in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} (empty bars) and 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice (full bars). §§ $p < 0.01$, significantly different from 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice ($n = 12$ animals per genotype).

dialysate 5-HT levels. By contrast, it is known that SERT distribution is unchanged in the frontal cortex or DRN of 5-HT_{1A}^{-/-} or 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Ase et al., 2001). While a repressive effect of high serotonin levels on SERT expression cannot be ruled out, no study has yet observed such an effect. Indeed, chronic SSRIs treatments are known to reduce SERT binding and protein levels without affecting mRNA, but by stimulating microRNA-16 levels (Baudry et al., 2010). Furthermore, no studies have looked at the effects of chronic treatment that increase serotonin levels (without acting directly on the serotonin transporter like monoamine oxydase A inhibitors) on serotonin transporter expression.

These neurochemical variations may account for the elevated basal body temperature found in these 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mutant mice. Basal body temperature was not changed in single 5-HT_{1A}^{-/-} mice (Gross et al., 2002), while stress-induced hyperthermia was described in single 5-HT_{1B}^{-/-} mice (Bouwknicht et al., 2001). Thus, surprisingly, the increased basal body temperature found in double mutant mice may result from the deletion of terminal 5-HT_{1B} autoreceptors rather than of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors.

The respective role of pre- versus postsynaptic 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors is difficult to fully discriminate. Microdialysis, electrophysiology and body temperature measurements are techniques that mainly assess the presynaptic receptors function/activity, and thus we observed that deletion of both these receptors relieve the inhibition exerted by these autoreceptors on serotonergic neurons. Behavioral analyses reflect roles of both pre- and postsynaptic receptors, thus rendering difficult the discrimination of each. However, as we published previously using genetic and pharmacologic approaches in the FST (Guilloux et al., 2006), postsynaptic 5-HT_{1B} receptors might be important for obtaining an antidepressant response to SSRI administration.

4.2. Acute SSRI treatment increases dialysate [5-HT] levels response, but has no antidepressant-like effect in the FST in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice

Genetic blockade of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors resulted in greater SSRI increases of dialysate 5-HT levels in the FCX and the DRN of 5-HT_{1A/1B}^{-/-} compared to 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice. Thus, in 5-HT_{1A/1B}^{-/-} mice, the 5-HT level response to acute SSRI treatment was similar to that of a chronic treatment in 5-HT_{1A/1B}^{+/+} mice, which leads to desensitization of both 5-HT_{1A} (Blair et al., 1987; Hervas et al., 2001) and 5-HT_{1B} autoreceptors (Moret and Briley, 1996; Sayer et al., 1999), that is responsible for a greater SSRI-induced increase in dialysate 5-HT levels (insert in Fig. 6A). By

Table 2Comparison between single and double constitutive KO mice for 5-HT_{1A} and/or 5-HT_{1B} receptors.

	5-HT _{1A} –/– (compared to respective controls)	5-HT _{1B} –/– (compared to respective controls)	5-HT _{1A/1B} –/– (compared to respective controls)
<i>Electrophysiology on 5-HT neurons in the DRN</i>			
Basal	↗ ≈200% (Richer et al., 2002)	Unchanged (Evrard et al., 1999)	↗ ≈200%
Acute SSRI	Not tested	↘ sensitivity (Evrard et al., 1999)	Not tested
Chronic SSRI	Not tested	Not tested	Not tested
<i>Microdialysis</i>			
Basal [5-HT]ext	Unchanged in the FCX (Guilloux et al., 2006), Striatum (He et al., 2001; Knobelmann et al., 2001b) and in the DRN (Bortolozzi et al., 2004; Guilloux et al., 2006)	Unchanged in the FCX (De Groote et al., 2002b; Trillat et al., 1997) and in the hippocampus (De Groote et al., 2002a; Trillat et al., 1997)	↗ 40% in FCX and DRN
Effects of Acute SSRI on [5-HT]ext	FCX and DRN: ↗ (Guilloux et al., 2006)	Hippocampus: ↗ (De Groote et al., 2002a; Malagie et al., 2002; Malagie et al., 2001) or unchanged (Knobelmann et al., 2001a; Knobelmann et al., 2001b). FCX ↗ x2 (De Groote et al., 2002b)	↗ ≈300% in FCX and DRN
Effects of Chronic SSRI on [5-HT]ext	Not tested	FCX and Hippocampus: unchanged (Gardier et al., 2003)	Not tested
<i>Behavior</i>			
Basal anxiety	↗ Anxiety (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998)	Unchanged (Sari, 2004)	↗ Anxiety
Acute SSRI	↗ of SSRI efficacy in the FST (Guilloux et al., 2006)	↘ of SSRI efficacy in the FST (Gardier et al., 2001)	↘ of SSRI efficacy in the FST
Chronic SSRI	Anxiety-phenotype unchanged (Santarelli et al., 2003)	Not tested	Reversion of the anxious-phenotype
<i>Body temperature</i>			
Basal	Unchanged (Groenink et al., 2003)	Unchanged (Groenink et al., 2003)	↗

comparison, selective 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptor antagonists have also been shown to potentiate the effects of an acute dose of SSRI on dialysate 5-HT levels in the frontal cortex of either wild-type mice (Malagie et al., 2001) or rats (Hervas et al., 2001). Interestingly, however, the increase in 5-HT dialysate after acute paroxetine in 5-HT_{1A/1B}–/– mice was not reflected in a greater antidepressant-like effect in the FST (Fig. 3).

Indeed, because 5-HT_{1A}–/– mice display a much greater sensitivity to acute SSRI in the FST (Guilloux et al., 2006), we expected to observe similar effects in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Here, we observed that a paroxetine dose that induced an antidepressant-like effect in 5-HT_{1A/1B}+/+ mice, decreased the mobility time in 5-HT_{1A/1B}–/– mice. Such a phenomenon could be due to the very high elevation of dialysate 5-HT levels in both the FCX and DRN following paroxetine administration (observed in microdialysis experiments), which could be reflected in this behavioral test as a serotonergic syndrome (i.e., mice are unable to swim during most of the test) (David et al., 2003b). However, at other low doses tested (1 and 4 mg/kg, i.p.), paroxetine had no antidepressant-like effect in 5-HT_{1A/1B}–/– mice (data not shown). Interestingly, paroxetine did not induce a similar effect after chronic administration, thus suggesting that, in the FST, effects obtained after acute or chronic paroxetine administration rely on different mechanisms. However, in keeping with our previous work, and here in 5-HT_{1A/1B}–/– mice after both acute and chronic paroxetine administration, we confirmed that activation of 5-HT_{1A} receptors dampens the effects of SSRI in the forced swim test (Guilloux et al., 2006), while activation of 5-HT_{1B} receptors is necessary to produce an antidepressant-like response in this test (Gardier et al., 2001).

4.3. Chronic SSRI treatment reverses the anxious-like phenotype of 5-HT_{1A/1B}–/– mice

To increase the validity of the present animal model of anxiety, we confirmed in the elevated plus maze test that 5-HT_{1A/1B}–/– mice

respond to the acute administration of diazepam, as reported in other mice with elevated anxiety (Griebel et al., 2000; Olivier et al., 2001). SSRIs can also be effective in relieving anxious states in patients, without inducing the dependence observed with benzodiazepines. Here, chronic (28-days) paroxetine treatment attenuated the basal anxious-like phenotype of 5-HT_{1A/1B}–/– mice in all behavioral tests performed. In 5-HT_{1A/1B}+/+ mice, it only had an effect in the NSF. These findings are consistent with clinical studies reporting beneficial effects of chronic SSRI treatment in anxiety disorders in humans, with only minor or no effects in control subjects (e.g., Stocchi et al., 2003). Similarly, SSRIs are effective in animal models of high anxious-like states, but not in controls or in non-anxious strains of mice (David et al., 2009; Dulawa et al., 2004). The possible mechanisms through which chronic paroxetine treatment has an anxiolytic-like effect could involve serotonin, but also other neurotransmitter systems. Indeed, paroxetine possesses moderate affinity (<50 nmol/L) for the norepinephrine and dopamine transporters (Owens et al., 2001) and *in vivo*, paroxetine has been shown to increase cortical extracellular levels of norepinephrine in mice (David et al., 2003a). Thus, the behavioral effects measured in 5-HT_{1A/1B}–/– mice after chronic SSRI treatment could reflect a combination of the action of antidepressants on both the serotonergic and other monoaminergic systems. Furthermore, the present data confirm the hypothesis that some behavioral effects of chronic SSRI might not require the activation of 5-HT_{1A} receptors (Holick et al., 2008), nor, as shown here, the activation of 5-HT_{1B} receptors. Other molecular and cellular phenomena, such as hippocampal neurogenesis could contribute to the anxiolytic-like effects of SSRIs, even though no study has yet clearly demonstrated the 5-HT_{1A} and/or 5-HT_{1B} receptor dependency of this process.

4.4. Concluding remarks

Table 2 summarizes major similarities and differences reported between single (literature) and double KO (here) mice for 5-HT_{1A}

and/or 5-HT_{1B} receptors. The phenotype of 5-HT_{1A/1B}–/– mice shows many similarities with that of 5-HT_{1A}–/– mice. However, deletion of both receptors did not block the response to antidepressant treatment in several tests of anxious-like behavior. While the present study focused on the impact of the combined deletion of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors on the brain serotonergic system, other neurotransmitter systems may be affected, especially since 5-HT_{1B} heteroreceptors are also known to control the release of GABA and glutamate (Maura et al., 1998). The 5-HT_{1A/1B}–/– mice model nevertheless emphasizes the role of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the physiopathology of anxiety, and reveals that the deletion of these two receptors does not significantly impact on the anxiolytic-like properties of a chronic SSRI treatment.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Animal Care Facility and the Transcriptome Platform of the “IFR141” of Paris XI University for their technical assistance.

Appendix. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version, at doi:10.1016/j.neuropharm.2011.02.009.

References

- Aghajanian, G.K., Vandermaelen, C.P., 1982. Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J. Neurosci.* 2, 1786–1792.
- Alexandre, C., Fabre, V., Popa, D., Hamon, M., Adrien, J., 2004. Decreased slow wave and increased REM sleeps level in mutant mice lacking 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors. *J. Sleep Res.* 13, 1.
- Ase, A.R., Reader, T.A., Hen, R., Riad, M., Descarries, L., 2000. Altered serotonin and dopamine metabolism in the CNS of serotonin 5-HT(1A) or 5-HT(1B) receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 75, 2415–2426.
- Ase, A.R., Reader, T.A., Hen, R., Riad, M., Descarries, L., 2001. Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout. *J. Neurochem.* 78, 619–630.
- Ball, S.G., Kuhn, A., Wall, D., Shekhar, A., Goddard, A.W., 2005. Selective serotonin reuptake inhibitor treatment for generalized anxiety disorder: a double-blind, prospective comparison between paroxetine and sertraline. *J. Clin. Psychiatry* 66, 94–99.
- Baudry, A., Mouillet-Richard, S., Schneider, B., Launay, J.M., Kellermann, O., 2010. miR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants. *Science* 329, 1537–1541.
- Bert, L., Favale, D., Jego, G., Greve, P., Guilloux, J.P., Guiard, B.P., Gardier, A.M., Suaud-Chagny, M.F., Lestage, P., 2004. Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. *J. Neurosci. Methods* 140, 53–57.
- Bielski, R.J., Bose, A., Chang, C.C., 2005. A double-blind comparison of escitalopram and paroxetine in the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *Ann. Clin. Psychiatry* 17, 65–69.
- Blier, P., de Montigny, C., Chaput, Y., 1987. Modifications of the serotonin system by antidepressant treatments: implications for the therapeutic response in major depression. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7, 24S–35S.
- Bonaventure, P., Nepomuceno, D., Kwok, A., Chai, W., Langlois, X., Hen, R., Stark, K., Carruthers, N., Lovenberg, T.W., 2002. Reconsideration of 5-hydroxytryptamine (5-HT)(7) receptor distribution using [(3)H]5-carboxamidotryptamine and [(3)H] 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetraline: analysis in brain of 5-HT(1A) knockout and 5-HT(1A/1B) double-knockout mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 302, 240–248.
- Borsini, F., Podhorna, J., Marazziti, D., 2002. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressants? *Psychopharmacology (Berl.)* 163, 121–141.
- Bortolozzi, A., Amargos-Bosch, M., Toth, M., Artigas, F., Adell, A., 2004. In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 88, 1373–1379.
- Bouwknicht, J.A., Hijzen, T.H., van der Gugten, J., Maes, R.A., Hen, R., Olivier, B., 2001. Absence of 5-HT(1B) receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT(1B) knockout mice. *Biol. Psychiatry* 49, 557–568.
- Brunner, D., Hen, R., 1997. Insights into the neurobiology of impulsive behavior from serotonin receptor knockout mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 836, 81–105.
- Brunner, D., Buhot, M.C., Hen, R., Hofer, M., 1999. Anxiety, motor activation, and maternal-infant interactions in 5HT1B knockout mice. *Behav. Neurosci.* 113, 587–601.
- Chaput, Y., de Montigny, C., Blier, P., 1986. Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 333, 342–348.
- Crabbe, J.C., Wahlsten, D., Dudek, B.C., 1999. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284, 1670–1672.
- David, D.J., Bourin, M., Jego, G., Przybylski, C., Jolliet, P., Gardier, A.M., 2003a. Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br. J. Pharmacol.* 140, 1128–1136.
- David, D.J., Renard, C.E., Jolliet, P., Hascoet, M., Bourin, M., 2003b. Antidepressant-like effects in various mice strains in the forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl.)* 166, 373–382.
- David, D.J., Samuels, B.A., Rainer, Q., Wang, J.W., Marsteller, D., Mendez, I., Drew, M., Craig, D.A., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Artymyshyn, R.P., Gardier, A.M., Gerald, C., Antonijevic, I.A., Leonardo, E.D., Hen, R., 2009. Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* 62, 479–493.
- Dawson, L.A., Hughes, Z.A., Starr, K.R., Storey, J.D., Bettelini, L., Bacchi, F., Arban, R., Poffe, A., Melotto, S., Hagan, J.J., Price, G.W., 2006. Characterisation of the selective 5-HT_{1B} receptor antagonist SB-616234-A (1-[6-(cis-3,5-dimethylpiperazin-1-yl)-2,3-dihydro-5-methoxyindol-1-yl]-1-[2'-methyl-4'-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)biphenyl-4-yl]methanone hydrochloride): in vivo neurochemical and behavioural evidence of anxiolytic/antidepressant activity. *Neuropharmacology* 50, 975–983.
- De Groote, L., Olivier, B., Westenberg, H.G., 2002a. The effects of selective serotonin reuptake inhibitors on extracellular 5-HT levels in the hippocampus of 5-HT (1B) receptor knockout mice. *Eur. J. Pharmacol.* 439, 93–100.
- De Groote, L., Olivier, B., Westenberg, H.G., 2002b. Extracellular serotonin in the prefrontal cortex is limited through terminal 5-HT(1B) autoreceptors: a microdialysis study in knockout mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 162, 419–424.
- Deltheil, T., Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Nicolas, L., Delomenie, C., Reperant, C., Le Maitre, E., Leroux-Nicollet, I., Benmansour, S., Coudore, F., David, D.J., Gardier, A.M., 2008. Consequences of changes in BDNF levels on serotonin neurotransmission, 5-HT transporter expression and function: studies in adult mice hippocampus. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 174–183.
- Dulawa, S.C., Holick, K.A., Gundersen, B., Hen, R., 2004. Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29, 1321–1330.
- Elizalde, N., Gil-Bea, F.J., Ramirez, M.J., Aisa, B., Lasheras, B., Del Rio, J., Tordera, R.M., 2008. Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology (Berl.)* 199, 1–14.
- Evraud, A., Laporte, A.M., Chastanet, M., Hen, R., Hamon, M., Adrien, J., 1999. 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors control the firing of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of the mouse: studies in 5-HT_{1B} knock-out mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 3823–3831.
- Gardier, A.M., Trillat, A.C., Malagie, I., David, D., Hascoet, M., Colombel, M.C., Jolliet, P., Jacquot, C., Hen, R., Bourin, M., 2001. 5-HT_{1B} serotonin receptors and antidepressant effects of selective serotonin reuptake inhibitors. *C.R. Acad. Sci. III* 324, 433–441.
- Gardier, A.M., David, D.J., Jego, G., Przybylski, C., Jacquot, C., Durier, S., Gruwez, B., Douvier, E., Beauverie, P., Poisson, N., Hen, R., Bourin, M., 2003. Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J. Neurochem.* 86, 13–24.
- Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G., Sanger, D.J., 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl.)* 148, 164–170.
- Gross, C., Zhuang, X., Stark, K., Ramboz, S., Oosting, R., Kirby, L., Santarelli, L., Beck, S., Hen, R., 2002. Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416, 396–400.
- Groenink, L., van Bogaert, M.J., van der Gugten, J., Oosting, R.S., Olivier, B., 2003. 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1B} receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. *Behav. Pharmacol.* 14, 369–383.
- Guiard, B.P., Guilloux, J.P., Reperant, C., Hunt, S.P., Toth, M., Gardier, A.M., 2007. Substance P neurokinin 1 receptor activation within the dorsal raphe nucleus controls serotonin release in the mouse frontal cortex. *Mol. Pharmacol.* 72, 1411–1418.
- Guiard, B.P., El Mansari, M., Blier, P., 2008. Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol. Pharmacol.* 74, 1463–1475.
- Guilloux, J.P., David, D.J., Guiard, B.P., Chenu, F., Reperant, C., Toth, M., Bourin, M., Gardier, A.M., 2006. Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/–)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 31, 2162–2172.
- He, M., Sibille, E., Benjamin, D., Toth, M., Shippenberg, T., 2001. Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res.* 902, 11–17.
- Heisler, L.K., Chu, H.M., Brennan, T.J., Danao, J.A., Bajwa, P., Parsons, L.H., Tecott, L.H., 1998. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15049–15054.
- Hervas, I., Vilario, M.T., Romero, L., Scorza, M.C., Mengod, G., Artigas, F., 2001. Desensitization of 5-HT(1A) autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* 24, 11–20.
- Holick, K.A., Lee, D.C., Hen, R., Dulawa, S.C., 2008. Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/c mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33, 406–417.

- Holmes, A., Wrenn, C.C., Harris, A.P., Thayer, K.E., Crawley, J.N., 2002. Behavioral profiles of inbred strains on novel olfactory, spatial and emotional tests for reference memory in mice. *Genes Brain Behav.* 1, 55–69.
- Klein, E., Zinder, O., Colin, V., Zilberman, I., Levy, N., Greenberg, A., Lenox, R.H., 1995. Clinical similarity and biological diversity in the response to alprazolam in patients with panic disorder and generalized anxiety disorder. *Acta Psychiatr. Scand.* 92, 399–408.
- Klemenhagen, K.C., Gordon, J.A., David, D.J., Hen, R., Gross, C.T., 2006. Increased fear response to contextual cues in mice lacking the 5-HT_{1A} receptor. *Neuropsychopharmacology* 31, 101–111.
- Knobelman, D.A., Hen, R., Blendy, J.A., Lucki, I., 2001a. Regional patterns of compensation following genetic deletion of either 5-hydroxytryptamine(1A) or 5-hydroxytryptamine(1B) receptor in the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1092–1100.
- Knobelman, D.A., Hen, R., Lucki, I., 2001b. Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 298, 1083–1091.
- Koks, S., Bourin, M., Voikar, V., Soosaar, A., Vasar, E., 1999. Role of CCK in anti-exploratory action of paroxetine, 5-HT reuptake inhibitor. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2, 9–16.
- Lader, M., 1994. Anxiolytic drugs: dependence, addiction and abuse. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 4, 85–91.
- Lopez-Rubalcava, C., Hen, R., Cruz, S.L., 2000. Anxiolytic-like actions of toluene in the burying behavior and plus-maze tests: differences in sensitivity between 5-HT(1B) knockout and wild-type mice. *Behav. Brain Res.* 115, 85–94.
- Malagie, I., Trillat, A.C., Bourin, M., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 2001. 5-HT_{1B} Autoreceptors limit the effects of selective serotonin re-uptake inhibitors in mouse hippocampus and frontal cortex. *J. Neurochem.* 76, 865–871.
- Malagie, I., David, D.J., Jolliet, P., Hen, R., Bourin, M., Gardier, A.M., 2002. Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT(1B) receptor knock-out mice. *Eur. J. Pharmacol.* 443, 99–104.
- Malleret, G., Hen, R., Guillou, J.L., Segu, L., Buhot, M.C., 1999. 5-HT_{1B} receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. *J. Neurosci.* 19, 6157–6168.
- Maura, G., Marcoli, M., Tortarolo, M., Andrioli, G.C., Raiteri, M., 1998. Glutamate release in human cerebral cortex and its modulation by 5-hydroxytryptamine acting at h 5-HT_{1D} receptors. *Br. J. Pharmacol.* 123, 45–50.
- Mochizuki, D., Tsujita, R., Yamada, S., Kawasaki, K., Otsuka, Y., Hashimoto, S., Hattori, T., Kitamura, Y., Miki, N., 2002. Neurochemical and behavioural characterization of milnacipran, a serotonin and noradrenaline reuptake inhibitor in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 162, 323–332.
- Moret, C., Briley, M., 1996. Effects of acute and repeated administration of citalopram on extracellular levels of serotonin in rat brain. *Eur. J. Pharmacol.* 295, 189–197.
- Olivier, B., Pattij, T., Wood, S.J., Oosting, R., Sarnyai, Z., Toth, M., 2001. The 5-HT(1A) receptor knockout mouse and anxiety. *Behav. Pharmacol.* 12, 439–450.
- Olivier, B., Zethof, T., Pattij, T., van Boogaert, M., van Oorschot, R., Leahy, C., Oosting, R., Bouwknecht, A., Veening, J., van der Gugten, J., Groenink, L., 2003. Stress-induced hyperthermia and anxiety: pharmacological validation. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 117–132.
- Owens, M.J., Knight, D.L., Nemeroff, C.B., 2001. Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol. Psychiatry* 50, 345–350.
- Parks, C.L., Robinson, P.S., Sibille, E., Shenk, T., Toth, M., 1998. Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 10734–10739.
- Ramboz, S., Saudou, F., Amara, D.A., Belzung, C., Segu, L., Misslin, R., Buhot, M.C., Hen, R., 1996. 5-HT_{1B} receptor knock out—behavioral consequences. *Behav. Brain Res.* 73, 305–312.
- Ramboz, S., Oosting, R., Amara, D.A., Kung, H.F., Blier, P., Mendelsohn, M., Mann, J.J., Brunner, D., Hen, R., 1998. Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 14476–14481.
- Richer, M., Hen, R., Blier, P., 2002. Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT_{1A} receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 435, 195–203.
- Rickels, K., Zaninelli, R., McCafferty, J., Bellew, K., Iyengar, M., Sheehan, D., 2003. Paroxetine treatment of generalized anxiety disorder: a double-blind, placebo-controlled study. *Am. J. Psychiatry* 160, 749–756.
- Roberts, C., Price, G.W., 2001. Interaction of serotonin autoreceptor antagonists in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro fast cyclic voltammetry study. *Neurosci. Lett.* 300, 45–48.
- Rocha, B.A., Searce-Levie, K., Lucas, J.J., Hiroi, N., Castanon, N., Crabbe, J.C., Nestler, E.J., Hen, R., 1998. Increased vulnerability to cocaine in mice lacking the serotonin-1B receptor. *Nature* 393, 175–178.
- Santarelli, L., Saxe, M., Gross, C., Surget, A., Battaglia, F., Dulawa, S., Weisstaub, N., Lee, J., Duman, R., Arancio, O., Belzung, C., Hen, R., 2003. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301, 805–809.
- Sari, Y., 2004. Serotonin_{1B} receptors: from protein to physiological function and behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 28, 565–582.
- Saudou, F., Amara, D.A., Dierich, A., LeMeur, M., Ramboz, S., Segu, L., Buhot, M.C., Hen, R., 1994. Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT_{1B} receptor. *Science* 265, 1875–1878.
- Sayer, T.J., Hannon, S.D., Redfern, P.H., Martin, K.F., 1999. Diurnal variation in 5-HT_{1B} autoreceptor function in the anterior hypothalamus in vivo: effect of chronic antidepressant drug treatment. *Br. J. Pharmacol.* 126, 1777–1784.
- Searce-Levie, K., Viswanathan, S.S., Hen, R., 1999. Locomotor response to MDMA is attenuated in knockout mice lacking the 5-HT_{1B} receptor. *Psychopharmacology (Berl.)* 141, 154–161.
- Schmittgen, T.D., Livak, K.J., 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Shippenberg, T.S., Hen, R., He, M., 2000. Region-specific enhancement of basal extracellular and cocaine-evoked dopamine levels following constitutive deletion of the Serotonin(1B) receptor. *J. Neurochem.* 75, 258–265.
- Siever, L.J., 2008. Neurobiology of aggression and violence. *Am. J. Psychiatry* 165, 429–442.
- Stein, D.J., Andersen, H.F., Goodman, W.K., 2005. Escitalopram for the treatment of GAD: efficacy across different subgroups and outcomes. *Ann. Clin. Psychiatry* 17, 71–75.
- Stocchi, F., Nordera, G., Jokinen, R.H., Lepola, U.M., Hewett, K., Bryson, H., Iyengar, M.K., 2003. Efficacy and tolerability of paroxetine for the long-term treatment of generalized anxiety disorder. *J. Clin. Psychiatry* 64, 250–258.
- Toth, M., 2003. 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 177–184.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Searce, K., Pons, D., Anmella, M.C., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 1997. Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT_{1B} receptors: in vivo microdialysis studies. *J. Neurochem.* 69, 2019–2025.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Bourin, M., Jacquot, C., Hen, R., Gardier, A.M., 1998a. Homozygote mice deficient in serotonin 5-HT_{1B} receptor and antidepressant effect of selective serotonin reuptake inhibitors. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 192, 1139–1147.
- Trillat, A.C., Malagie, I., Mathe-Allainmat, M., Anmella, M.C., Jacquot, C., Langlois, M., Gardier, A.M., 1998b. Effects of WAY 100635 and (-)-5-Me-8-OH-DPAT, a novel 5-HT_{1A} receptor antagonist, on 8-OH-DPAT responses. *Eur. J. Pharmacol.* 347, 41–49.
- Van der Heyden, J.A., Zethof, T.J., Olivier, B., 1997. Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol. Behav.* 62, 463–470.
- Yilmazer-Hanke, D.M., 2008. Morphological correlates of emotional and cognitive behaviour: insights from studies on inbred and outbred rodent strains and their crosses. *Behav. Pharmacol.* 19, 403–434.
- Zhuang, X., Gross, C., Santarelli, L., Compan, V., Trillat, A.C., Hen, R., 1999. Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT_{1A} or 5-HT_{1B} receptors. *Neuropsychopharmacology* 21, 525–605.

ARTICLE 2: Les autorécepteurs 5-HT_{1A} sont nécessaires et suffisants pour la formation normale des circuits qui sous-tendent l'anxiété innée

Richardson-Jones JW, Craige CP, Hai Thanh Nguyen, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Guiard BP, Beck SG, Hen R, Leonardo ED.

The journal of Neuroscience, 31(16) : 6008-6018

Résumé : Le but de cette étude était de distinguer le rôle de l'auto- et de l'hétéro-récepteur 5-HT_{1A} à l'aide de souris transgéniques privées de l'un ou de l'autre de ces récepteurs au cours des périodes de la vie distinctes (tout au long de la vie ou à l'âge adulte).

Principaux résultats

- A l'aide de la technique d'électrophysiologie, il a été observé que l'activation de la décharge électrique des neurones 5-HT dans le NRD induite par le 5-CT (agoniste 5-HT_{1,7}) était diminuée dans le noyau du raphé chez la souris Auto-KO et dans la région CA1 de l'hippocampe chez la souris Hétéro-KO. De plus, dans le test présynaptique d'hypothermie induite par le 8-OH-DPAT (agoniste des autorécepteurs 5-HT_{1A}), une diminution de la température corporelle basale a été reportée chez la souris Hétéro-KO mais pas chez la souris Auto-KO validant ainsi nos modèles d'étude.

- A l'aide de la technique de microdialyse intracérébrale, nous avons pu observer qu'en conditions basales, les souris Auto-KO possédaient des concentrations corticales extracellulaires de 5-HT ([5-HT]_{ext}) plus élevées par rapport aux souris contrôles (Auto-WT). De plus, la délétion de ce récepteur a permis de potentialiser l'effet d'une dose challenge de fluoxétine (400%) par rapport aux souris auto-WT (250%).

- A l'aide des tests comportementaux, les résultats ont montré que les souris Auto-KO présentaient un phénotype anxieux sans toutefois de modifications de réponse dans le test de la nage forcée. Les souris Hétéro-KO, dont la mutation a été provoquée à l'âge adulte n'ont présenté aucune modification de leur comportement dans les tests d'anxiété ou de désespoir. En revanche, l'inactivation des hétéro-récepteurs depuis le début de la vie a diminué le temps de mobilité dans le FST chez les souris hétéro-KO comparées au souris contrôles.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats a permis d'établir des rôles distincts pour les deux populations de récepteurs (auto- et hétéro-récepteur 5-HT_{1A}) dans la modulation des comportements de type anxieux et non anxieux. Contrairement aux hétéro-récepteurs, il semble que les autorécepteurs 5-HT_{1A} soient nécessaires et suffisants pour l'établissement des comportements anxieux.

Serotonin-1A Autoreceptors Are Necessary and Sufficient for the Normal Formation of Circuits Underlying Innate Anxiety

Jesse W. Richardson-Jones,¹ Caryne P. Craige,² Thanh H. Nguyen,³ Hank F. Kung,⁴ Alain M. Gardier,³ Alex Dranovsky,^{1,6} Denis J. David,³ Bruno P. Guiard,³ Sheryl G. Beck,² René Hen,^{1,5,6} and E. David Leonardo^{1,6}

¹Department of Psychiatry, Columbia University, New York, New York 10032, ²Department of Anesthesiology, Children's Hospital of Philadelphia and University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, ³Faculté Pharmacie, Université Paris Sud, Châtenay-Malabry, F-92296 France, ⁴Department of Radiology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104, ⁵Department of Neuroscience, Columbia University, New York, New York 10032, and ⁶The New York State Psychiatric Institute, New York, New York 10032

Identifying the factors contributing to the etiology of anxiety and depression is critical for the development of more efficacious therapies. Serotonin (5-HT) is intimately linked to both disorders. The inhibitory serotonin-1A (5-HT_{1A}) receptor exists in two separate populations with distinct effects on serotonergic signaling: (1) an autoreceptor that limits 5-HT release throughout the brain and (2) a heteroreceptor that mediates inhibitory responses to released 5-HT. Traditional pharmacologic and transgenic strategies have not addressed the distinct roles of these two receptor populations. Here we use a recently developed genetic mouse system to independently manipulate 5-HT_{1A} autoreceptor and heteroreceptor populations. We show that 5-HT_{1A} autoreceptors act to affect anxiety-like behavior. In contrast, 5-HT_{1A} heteroreceptors affect responses to forced swim stress, without effects on anxiety-like behavior. Together with our previously reported work, these results establish distinct roles for the two receptor populations, providing evidence that signaling through endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors is necessary and sufficient for the establishment of normal anxiety-like behavior.

Introduction

Anxiety and depression are highly comorbid disorders with partially overlapping genetic predisposition, environmental risk, symptom dimensions, and treatment profiles (Ressler and Nemeroff, 2000; Nemeroff, 2002). This overlap suggests that anxiety and depression share some circuitry and neurochemistry, but can be influenced by distinct factors.

Serotonin (5-HT) participates in the etiology and treatment of both anxiety and depression (Rush et al., 2006; Davidson, 2009). The most common treatments for major depressive disorder and many anxiety disorders are the selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), which are thought to exert their therapeutic effects by increasing extracellular 5-HT levels (Gartside et al., 1995). However, in contrast to the beneficial effects of SSRIs in adults, evidence from rodent models suggest that SSRI treatment during early development increases anxiety or depression later in life (Caspi et al., 2003; Lira et al., 2003; Ansorge et al., 2008;

Olivier et al., 2008; Oberlander et al., 2009). Thus, 5-HT may affect immature and mature mood-related circuitry differently.

Serotonin is released throughout the forebrain by axons emanating from cell bodies located in the midbrain raphe (Barnes and Sharp, 1999). The largely neuromodulatory effects of 5-HT are mediated through 14 receptor subtypes, whereas 5-HT levels are limited by two inhibitory autoreceptors expressed on 5-HT raphe neurons (Barnes and Sharp, 1999). The 5-HT_{1A} receptor, a major inhibitory receptor subtype, is expressed on 5-HT raphe neurons as an autoreceptor, limiting released 5-HT at nerve terminals, and in diverse target regions as a heteroreceptor mediating cellular responses to released 5-HT. In particular, 5-HT_{1A} heteroreceptors are highly expressed in forebrain regions that regulate mood and anxiety, such as the prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala (Hamon et al., 1990; Beck et al., 1992; Riad et al., 2000). Thus, the 5-HT_{1A} receptor can influence anxiety or depression by impacting either 5-HT levels (as an autoreceptor) or the limbic response to released 5-HT (as a heteroreceptor).

Diverse evidence has demonstrated that 5-HT_{1A} receptors contribute to the establishment of mood disorders. A functional polymorphism in the promoter region of the human *Htr1a* gene (coding for the human 5-HT_{1A} receptor) that regulates receptor levels is linked to depression, response to antidepressants, and amygdala reactivity (Lemondet et al., 2003; Le François et al., 2008; Fakra et al., 2009). Mice lacking all 5-HT_{1A} receptors throughout life display increased anxiety-like behavior (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998), an effect that is phenocopied by pharmacological blockade during the first few postnatal weeks (Lo Iacono and Gross, 2008). Transgenic gain-

Received Nov. 2, 2010; revised Feb. 11, 2011; accepted Feb. 23, 2011.

Author contributions: J.W.R.J., A.M.G., A.D., D.J.D., S.G.B., R.H., and E.D.L. designed research; J.W.R.J., C.P.C., T.H.N., D.J.D., B.P.G., and E.D.L. performed research; H.F.K. contributed unpublished reagents/analytic tools; J.W.R.J., A.M.G., A.D., B.P.G., S.G.B., R.H., and E.D.L. analyzed data; J.W.R.J. and E.D.L. wrote the paper.

We thank Matheus Araujo for technical assistance. This work was supported by NIH Grants K08 MH076083 and R01 MH091427 to E.D.L., a NARSAD Young Investigator Award to E.D.L., R01 MH075047 to S.G.B., R01 MH068542 to R.H., a NARSAD Distinguished Investigator Award to R.H. and AstraZeneca Grant CU08-8439 to R.H.

R.H. receives compensation as a consultant for BrainCells, in relation to the generation of novel antidepressants. E.D.L. receives compensation as a consultant from PGxHealth.

Correspondence should be addressed to either Dr. E. David Leonardo or René Hen, Department of Psychiatry, Columbia University/New York State Psychiatric Institute, 1051 Riverside Drive, Box 87, New York, New York 10032. E-mail: e1367@columbia.edu or rh95@columbia.edu.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.5836-10.2011

Copyright © 2011 the authors 0270-6474/11/316008-11\$15.00/0

of-function studies have likewise suggested that the 5-HT_{1A} receptor can stably impact anxiety-like behavior during the first weeks of life (Gross et al., 2002; Bert et al., 2006). Given this evidence, 5-HT_{1A} receptors may influence anxiety and depression differentially not only between subpopulations, but also across developmental stages in an animal.

Separating both the temporal (developmental vs adult) and spatial (autoreceptor vs heteroreceptor) roles of the endogenous 5-HT_{1A} receptor in anxiety and depression has proven difficult with existing genetic or pharmacological techniques. To independently assess the functional role of endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors, we developed a genetic mouse system with temporal and spatial specificity and tested the adult phenotype of these animals in a number of classic, mood-related paradigms.

Materials and Methods

Transgenic mice

5-HT_{1A} autoreceptor knock-out mice. Mice with suppressible 5-HT_{1A} receptors (*Htr1a*^{tetO}) were bred as described previously (Richardson-Jones et al., 2010). *Htr1a*^{tetO/tetO} mice demonstrate a pattern of 5-HT_{1A} receptors that is indistinguishable from the wild-type pattern. Mice with inducible suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors were homozygous for the tetO insertion (*Htr1a*^{tetO/tetO}), possessed one copy of the raphe-specific tTS suppressor transgene, *Pet1*-tTS, and were maintained in the absence of doxycycline (dox) throughout life (Richardson-Jones et al., 2010).

5-HT_{1A} heteroreceptor knock-out mice. Heteroreceptor-specific suppression was achieved by placing tTS under transcriptional control of elements of the α -CaMKII promoter (Mayford et al., 1996). Briefly, an EcoRI–BamHI fragment containing the tTS coding sequence was freed from the pAct tTS plasmid (Mallo et al., 2003). The fragment was blunted and cloned into the EcoRV site of the pNN265 plasmid, flanking it with a generic 5' intron, 3' intron, and SV40 polyA sequence (Mayford et al., 1996). The tTS sequence flanked by introns was freed by digest with NotI and cloned into the pMM403 plasmid, placing it under the control of α -CaMKII promoter fragments. Lastly, the promoter fragments and tTS coding sequence (CamK–tTS) were freed by Sfi/Srf digest and subjected to pronuclear injection into B6CBA/F2 hybrid zygotes. Founders were screened by PCR for tTS as described previously (Richardson-Jones et al., 2010) and by Southern blot analysis.

Seven founder lines were generated, bred to the *Htr1a*^{tetO/tetO} background, and screened for suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors. The three general patterns of suppression in these lines corresponded to the previous reported activity of these promoter fragments: (1) suppression of all receptors in the brain, (2) preferential suppression of forebrain receptors while sparing receptors in the raphe, and (3) preferential suppression of dorsal hippocampal receptors while sparing most other receptor populations (data not shown) (Gross et al., 2002; Pittenger et al., 2002). One line was identified that displayed suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors without affecting autoreceptors, and this line was used for subsequent experiments. Mice with inducible suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors were homozygous for the tetO insertion (*Htr1a*^{tetO/tetO}), possessed one copy of the forebrain-specific tTS suppressor transgene CamK–tTS, and were maintained in the absence of dox throughout life.

For all experiments, male *Htr1a*^{tetO/tetO}/*Pet1*-tTS⁺ and *Htr1a*^{tetO/tetO}/*CamK*-tTS⁺ mice were bred to *Htr1a*^{tetO/tetO} females. Thus, the tTS transgene was transmitted through the male germline, ensuring that all pups were raised by mothers of the same genotype, regardless of dox status. All experiments were conducted on male offspring. Animals were maintained on a mixed 129Sv/Sv, C57B6, CBA background. To control for the effect of transgene insertion and genetic background, controls for all experimental groups were generated by feeding *Htr1a*^{tetO/tetO}/*Pet1*-tTS⁺ or *Htr1a*^{tetO/tetO}/*CamK*-tTS⁺ animals chow containing 40 mg/kg dox (product #F5545; Bioserv) throughout life. Dox exposure *in utero* in these animals was accomplished by feeding mothers with the dox chow throughout the course of breeding. Experimental animals were fed standard laboratory chow (Prolab Isopro RMH 3000; PMI Nutrition

International) either throughout life [autoreceptor–knock-out (auto-KO) and heteroreceptor–knock-out (hetero-KO)] or beginning at postnatal day 50 (adult hetero-KO). To control for the possible effects of dox on behavior, littermate controls lacking the tTS transgene, in which dox had no effect on 5-HT_{1A} receptor expression, were also tested in baseline behavioral experiments. For all tests presented, dox exposure alone did not result in any behavioral changes (data not shown).

Animal husbandry

Animals were housed in groups of three to five per cage and had *ad libitum* access to food and water. Animals were maintained on a 12:12 light/dark schedule; all testing was conducted during the light period. Animal protocols were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee and were conducted in accordance to the *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Care was taken to minimize the number of animals used and their suffering.

Receptor autoradiography

Mice were killed by cervical dislocation and decapitation. Extracted brains were frozen immediately on crushed dry ice (−75°C) and maintained at −80°C until sectioning. Brains were cryosectioned at a thickness of 18 μ m and sections were thaw-mounted on Superfrost slides (Fisher Scientific). Sections were maintained at −80°C until processing. Mounted sections were processed for 4-(2'-methoxyphenyl)-1-[2'-(*n*-2"-pyridinyl)-p-[¹²⁵I]iodobenzamido]ethylpiperazine (¹²⁵I-MPPI) autoradiography and receptor levels were quantified using a previously described method (Richardson-Jones et al., 2010).

Electrophysiology

Whole-cell recordings of dorsal raphe and hippocampal CA1 pyramidal neurons were made as previously described (Beck et al., 2004; Tsetsenis et al., 2007; Crawford et al., 2010). In brief, mice were killed using decapitation. While submerged in a cold artificial CSF (aCSF) solution where NaCl had been replaced with sucrose (248 mM), the coronal slices were cut at the level of the dorsal hippocampus and midbrain with a VT1000s vibratome (Leica Microsystems) to generate 200 μ m thick brain slices. Slices were maintained in aCSF bubbled with 95%O₂/5%CO₂ at 36°C for 1 h and then at room temperature until used. Individual slices were then placed in a recording chamber and continuously perfused with 32–34°C aCSF solution bubbled with 95%O₂/5%CO₂ with a solution flow rate of 1.5–2 ml/min. The composition of the aCSF was as follows (in mM): 124 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2.0 MgSO₄, 2.5 CaCl₂, 10 dextrose, and 26 NaHCO₃. Neurons were visualized using Nikon E600 (Optical Apparatus) upright microscope fitted with a 40 $\times$ water-immersion objective, differential interference contrast, and infrared filter. Whole-cell recording pipettes fabricated on a pipette puller (P-97; Sutter Instrument) had a resistance of 6–10 M Ω when filled with an intracellular solution containing the following (in mM): 130 K-gluconate, 5 NaCl, 10 Na-phosphocreatinine, 1 MgCl₂, 0.02 EGTA, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.5 Na₂GTP, and 0.1% biocytin, pH 7.3. Recordings were collected online with a Multiclamp 700B amplifier, Digidata 1320 A/D converter, and Clampex 9.0 software (Molecular Devices). In current-clamp recording, resting membrane potential, action potential (AP) threshold, AP duration, after-hyperpolarization (AHP) amplitude, and the time it takes for the AHP to depolarize to one-half its peak amplitude were measured directly from traces, as previously described (Crawford et al., 2010). In voltage clamp, with a holding potential of −60 mV, the magnitude of the outward current elicited by bath application of 100 nM 5-carboxy-amidotryptamine (5-CT) was measured. 5-CT was chosen for these experiments instead of 8-OH-DPAT as it is a high affinity full agonist, is less lipophilic, and washes out more easily from the slices. Following the experiment, slices were fixed for 2–3 h with 4% paraformaldehyde and the midbrain slices were processed for immunohistochemical detection of tryptophan hydroxylase (TPH). Identity of all recorded cells was confirmed by visualization of the biocytin-filled cells. Immunohistochemical identification of each neuron recorded in patch-clamp configuration was completed as previously described (Beck et al., 2004; Lemos et al., 2006; Kirby et al., 2008). In brief, a standard immunohistochemistry protocol was used on 200- μ m-thick slices using mouse anti-TPH (1:200; Sigma) along with secondary donkey anti-mouse Alexa Fluor

488 (1:200; Invitrogen). Biocytin-filled cells were visualized with streptavidin-conjugated Alexa Fluor G38 (1:100; Invitrogen). These cells were also labeled with NeuN (1:500; Sigma), which was visualized with a donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200; Invitrogen) secondary antibody. TPH labeling of biocytin-filled cells was imaged on a DMR fluorescent microscope (Leica Microsystems) using OpenLab 3.0.9 software (Improvision) and confirmed on a DMIRE2 confocal microscope (Leica Microsystems) using confocal software (version 2.5; Leica Microsystems).

Intracerebral *in vivo* microdialysis

Extracellular 5-HT levels were measured by *in vivo* microdialysis as previously described (Guiard et al., 2008). Briefly, two concentric dialysis probes were implanted in the ventral hippocampus (vHPC) and prefrontal cortex (PFC) (outer diameter by active length: 0.3×1.6 mm and 0.3×2 mm, respectively) of anesthetized mice (chloral hydrate, 400 mg/kg, i.p.). Stereotaxic coordinates were as follows (in mm): PCF: anterior, 1.6; lateral, 1.3; ventral, 1.6; vHPC: anterior, -2.8 ; lateral, 3.0; ventral, 3.0 (Franklin and Paxinos, 1997). Animals were allowed to recover for a period of 24 h. Following recovery, probes were continuously perfused with aCSF, and dialysates were collected every 15 min for analysis by HPLC-amperometry (Guiard et al., 2008). Baseline 5-HT levels were calculated as the average of the first four samples, $\pm$ SEM. Freely moving mice were treated ($t = 0$) with either a challenge dose of fluoxetine (18 mg/kg; i.p.) or its vehicle, and dialysate samples were collected for a 0–120 min post-treatment period. The limit of sensitivity for 5-HT was 0.5 fmol/sample (signal-to-noise ratio, 2). Following sample collection, brains were removed and sectioned to ensure proper probe placement.

Behavioral and physiological testing

All animals used for behavioral testing were age matched within 2 weeks. Animals were initially tested at 11–13 weeks of age, at least 4 weeks after the cessation of dox in adult heteroreceptor-KO animals. Baseline anxiety tests were completed before other behavioral tests.

8-OH-DPAT-induced hyperthermia. Body temperature was assessed intrarectally using a lubricated probe inserted ~ 2 cm and a Thermalert TH-5 thermal monitor (Physitemp). Mice were singly housed in clean cages for 10 min and three baseline body temperature measurements were taken. Ten minutes after the third baseline measurement, animals received 8-OH-DPAT intraperitoneally at the doses indicated and body temperature was monitored every 10 min for a total of 50 min. Temperatures are represented as a change from the final baseline measurement.

Stress-induced hyperthermia. The stress-induced hyperthermia paradigm measures a physiologic response to a stressful stimulus (Adriaan Bouwknicht et al., 2007). Briefly, animals in their home cages were moved to a testing room and allowed to acclimate for 1 h. One animal per cage was removed and a baseline body temperature was measured intrarectally. Each animal was then placed in a novel, clean cage for 10 min, after which a second body temperature was recorded.

Open-field test. Exploration in response to a novel open field was measured as described previously (Richardson-Jones et al., 2010). Dependent measures were total path length (in cm), number, and percentage of distance in the center (distance traveled in the center divided by the total distance traveled).

Light/dark choice test. Exploration of the light/dark chamber was measured as described previously (Richardson-Jones et al., 2010). Dependent measures were total distance and percentage of time spent in the light compartment.

Modified forced-swim test. Behavioral response to forced swimming was assayed as described previously (David et al., 2007). Briefly, mice were placed into clear plastic buckets 20 cm in diameter and 23 cm deep, filled two-thirds of the way up with 26°C water and videotaped from the side. Mice had a 2 min pretest period before initiating scoring, after which two consecutive 2 min periods were scored. All animals were exposed to the swim test on two consecutive days. Scoring was done using an automated Viewpoint Videotrack software package. Dependent variables were immobility, swimming, and climbing.

Statistical analysis

In general, the effect of treatment or dose was analyzed using an ANOVA, using repeated measures where appropriate. Significant ANOVAs were followed up with Fisher protected least significant difference test for behavioral and physiological measures, and with Student–Neuman–Keuls *t* test for electrophysiological characterization.

Results

Conditional suppression of the 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors

Previous attempts to target autoreceptor versus heteroreceptor populations independently in mice relied on transgenic gain-of-function strategies using heterologous promoters that resulted in overexpression and misexpression of the receptor (Gross et al., 2002; Kusserow et al., 2004; Bert et al., 2006; Audero et al., 2008). Such approaches fall short of establishing causal links between endogenous receptor populations and either circuit function or behavior. To independently manipulate either 5-HT_{1A} heteroreceptors or autoreceptors while maintaining endogenous expression of the other receptor population, we used the tTS/tetO system to suppress 5-HT_{1A} receptor transcription from the *Htr1a* gene locus. We previously reported the generation of mice that allow for specific suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors, using two engineered mouse lines: a raphe-specific tTS transgenic line and a knock-in mouse line with tetO sites inserted between the promoter and coding regions of the *Htr1a* locus (Richardson-Jones et al., 2010). To suppress 5-HT_{1A} autoreceptors in the raphe throughout life (auto-KO), the previously described *Htr1a^{tetO/tetO}/Pet1-tTS⁺* mice were maintained in the absence of dox throughout life (Fig. 1C,D). Controls for these mice, in which 5-HT_{1A} autoreceptors were not suppressed, were generated by maintaining *Htr1a^{tetO/tetO}/Pet1-tTS⁺* mice in the presence of dox throughout life (Fig. 1A,D). Quantitative receptor autoradiography revealed that $<20\%$ of control 5-HT_{1A} receptor binding remained in the dorsal raphe of adult auto-KO mice (one-tailed *t* test in the dorsal raphe, $t_{13} = -15.503$, $p < 0.0001$), whereas no changes were observed in binding of 5-HT_{1A} in areas of high heteroreceptor expression, such as the amygdala, hippocampus, and entorhinal cortex (repeated-measures ANOVA with brain region as a within-subject factor and group as a between-subject factor, main effect of group $F_{(1,13)} = 1.398$, $p = 0.2583$; region-by-group interaction, $F_{(1,13)} = 0.795$, $p = 0.46232$) (Fig. 2). Attempts with this line to fully suppress the autoreceptor beginning in adulthood resulted in a modest 30% reduction in raphe 5-HT_{1A} expression. Physiological and behavioral characterization of these animals has been reported previously (Richardson-Jones et al., 2010). The reason for more effective suppression of 5-HT_{1A} transcription in animals maintained in the absence of dox throughout life remains unclear, although it appears that early developmental suppression at the 5-HT_{1A} locus may be irreversible (data not shown).

To generate mice with suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors without affecting autoreceptors, we first created a transgenic mouse line with tTS expression directed by promoter elements from the α -CaMKII gene (Mayford et al., 1996). One mouse line was identified that demonstrated suppression of only 5-HT_{1A} forebrain heteroreceptors without affecting 5-HT_{1A} raphe autoreceptors (hetero-KO) (ANOVA in dorsal raphe, $F_{(2,9)} = 0.429$, $p < 0.6635$) (Figs. 1B,E; 2B,D). In hetero-KO mice, receptor expression was undetectable in the hippocampus, amygdala, or prefrontal cortex, whereas low levels of receptor remained in the olive, entorhinal cortex, and the medial and lateral septum

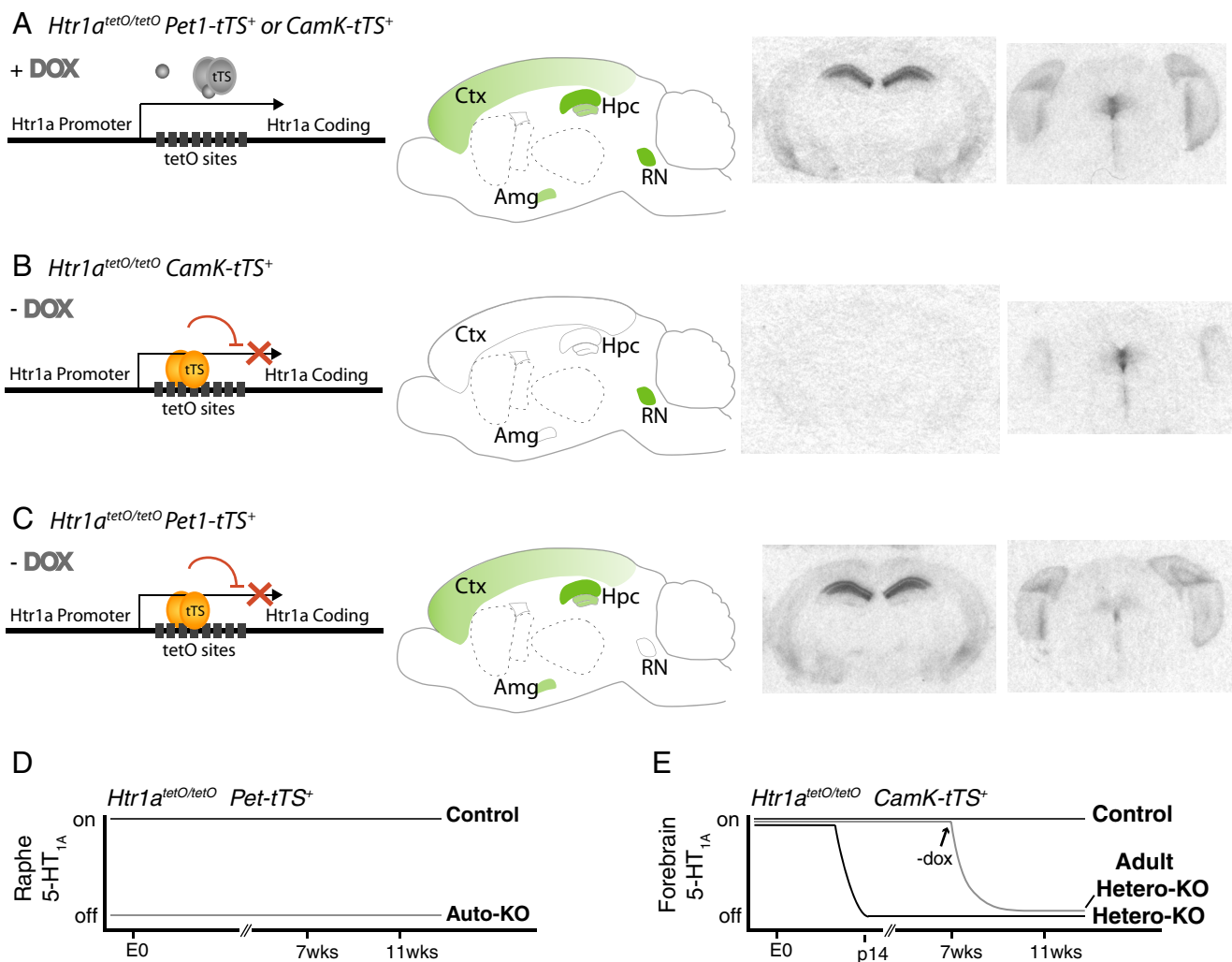


Figure 1. *A*, Adult mice homozygous for the regulatable *Htr1a*^{tetO} allele and possessing one copy of a tTS transgene express 5-HT_{1A} receptors in normal patterns in the brain when maintained on doxycycline, assessed by ¹²⁵I-MPPI autoradiography and shown in coronal sections at the level of the hippocampus and raphe nucleus. A schematic of normal 5-HT_{1A} receptor binding in the sagittal plane is shown for reference. *B*, Adult mice homozygous for the regulatable *Htr1a*^{tetO} allele and possessing one copy of the α -CaMKII-tTS transgene express 5-HT_{1A} raphe autoreceptors normally, but show almost no binding of forebrain receptors when maintained in the absence of doxycycline. *C*, Adult mice homozygous for the regulatable *Htr1a*^{tetO} allele and possessing one copy of the *Pet1*-tTS transgene express 5-HT_{1A} forebrain heteroreceptors normally, but show almost no binding of raphe autoreceptors when maintained in the absence of doxycycline. *D*, Mice lacking 5-HT_{1A} autoreceptors (auto-KO) and mice with autoreceptors intact (control) were generated by maintaining *Htr1a*^{tetO/tetO}*Pet1-tTS*⁺ mice in the absence or presence of doxycycline throughout life. *E*, Mice lacking 5-HT_{1A} heteroreceptors (hetero-KO) and mice with heteroreceptors intact (control) were generated by maintaining *Htr1a*^{tetO/tetO} α -CaMKII-tTS⁺ mice in the absence or presence of doxycycline throughout life. Mice lacking heteroreceptors beginning in adulthood (adult hetero-KO) were maintained on doxycycline until 7 weeks of age. Ctx, Cortex; Amg, amygdala; Hpc, hippocampus; RN, raphe nucleus; E0, day 0; p14, postnatal day 14.

(ANOVA for the effect of group in hippocampus, $F_{(2,9)} = 20,210$; $p < 0.0001$) (Fig. 2*B,D*). Consistent with the expected delayed developmental activation of the α -CaMKII promoter elements, we confirmed that suppression of receptors was complete by postnatal day 14 (Fig. 2*E*). Control mice, in which 5-HT_{1A} heteroreceptors were not suppressed, were generated by maintaining *Htr1a*^{tetO/tetO}/*CaMKII-tTS*⁺ mice in the presence of dox throughout life (Fig. 1*E*). Adult suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors (adult hetero-KO) was achieved by maintaining *Htr1a*^{tetO/tetO}/*CaMKII-tTS*⁺ mice in the presence of dox until postnatal day 50, then withdrawing dox for at least 4 weeks. Adult suppression of 5-HT_{1A} receptors in these animals was as effective as early developmental suppression (Figs. 1*E*, 2*B,D*).

Altered agonist response in mice with conditional suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors

To directly confirm the functional impact of receptor suppression revealed by autoradiography, we performed whole-cell

recordings of neurons in acute slice in response to the 5-HT_{1,7} agonist 5-CT. Cellular responses were recorded in the dorsal raphe of auto-KO mice and their controls and in area CA1 of the hippocampus in hetero-KO mice and their controls. Following recording, cells were filled with biocytin. Pyramidal neurons in the hippocampus were confirmed by morphological features and raphe neurons were confirmed as serotonergic by immunohistochemistry for tryptophan hydroxylase (data not shown).

In agreement with the decreased 5-HT_{1A} autoreceptor levels indicated by autoradiography, serotonergic neurons in the dorsal raphe of auto-KO mice had a significantly decreased current response to 5-CT (two-tailed *t* test, $t_{35} = 8.432$, $p < 0.0001$) (Fig. 3*A–C*). Indeed, we were unable to detect any response to 5-CT (defined as current < 5 pA) in 5-HT dorsal raphe neurons of auto-KO mice, consistent with a lack of functional 5-HT_{1A} raphe autoreceptors in these animals. The small amount of remaining

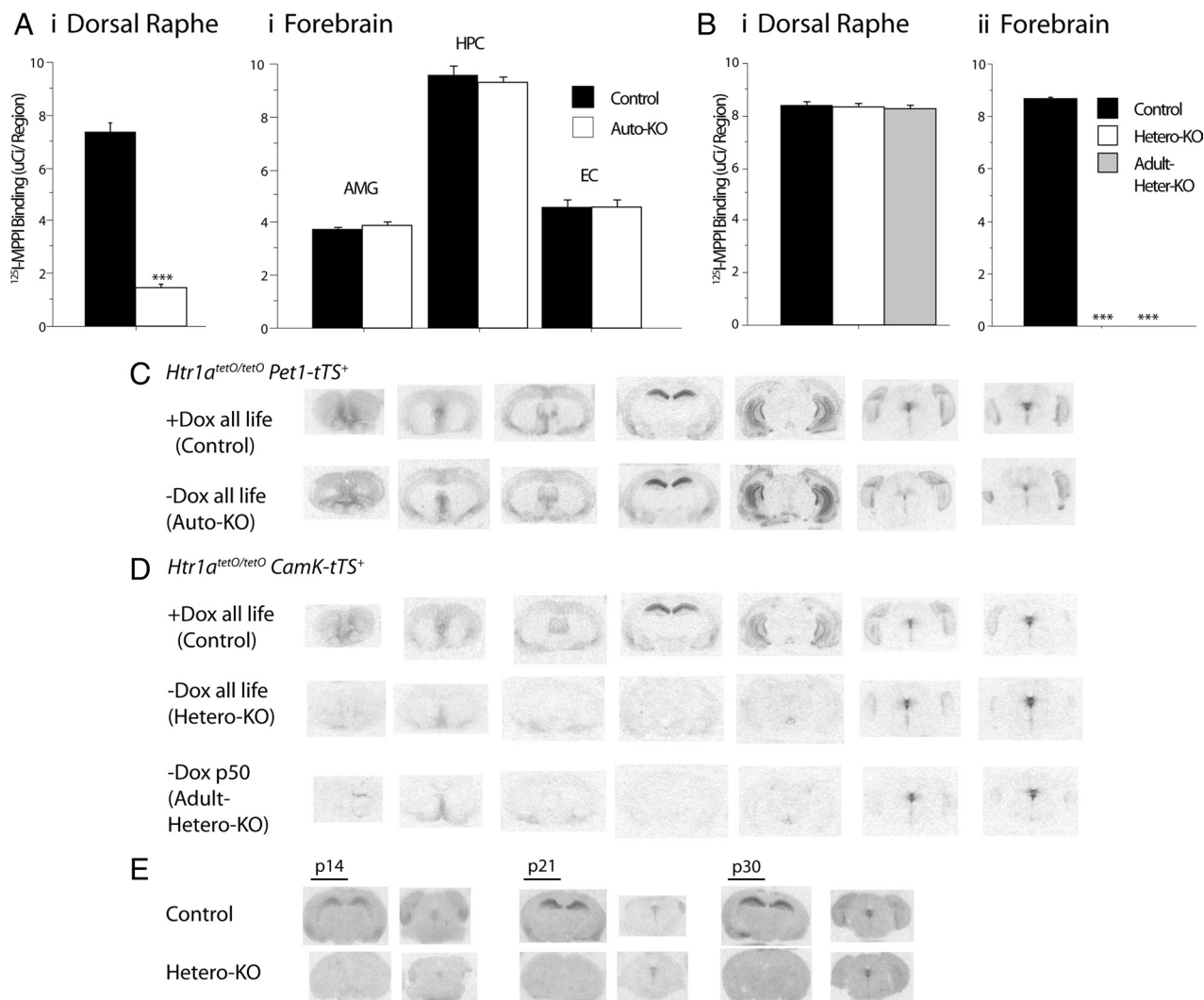


Figure 2. *A*, Quantitative ¹²⁵I-MPPI autoradiography for 5-HT_{1A} receptors revealed a significant decrease in the dorsal raphe (*i*) of auto-KO mice compared with their matched controls. Conversely, no difference was detected in forebrain regions (*ii*), such as the ventral dentate gyrus of the hippocampus (HPC), the amygdala (AMG), and the entorhinal cortex (EC). *B*, *i*, No difference was detected in binding in the dorsal raphe of hetero-KO or adult hetero-KO mice compared with their matched controls. *ii*, Conversely, binding was significantly decreased in dorsal CA1 of the hippocampus in both groups compared with control ($N = 3$ –7/group). All values are mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.0001$. *C*, *D*, Matched autoradiograms showing detailed expression patterns of 5-HT_{1A} receptors binding across the rostrocaudal extent of the brain in coronal section comparing auto-KO mice and their controls (*C*) and hetero-KO and adult hetero-KO mice and their controls (*D*). Low levels of heteroreceptors remain in parts of the septum, olivary nucleus, and entorhinal cortex. *E*, Receptor binding in the postnatal developmental period in hetero-KO mice and their controls. Matched sections are shown at the level of the dorsal hippocampus and the dorsal raphe nucleus. Forebrain receptor suppression is complete by postnatal day (p) 14.

receptor binding in the dorsal raphe may represent either desensitized 5-HT_{1A} autoreceptors or receptors on non-5-HT raphe neurons (Kirby et al., 2003; Beck et al., 2004).

In pyramidal neurons in area CA1 of hetero-KO mice, we observed a large decrease in the average current response to 5-CT (one-tailed t test, $t_{39} = -3.254$, $p = 0.0012$) (Fig. 3*D–F*), consistent with the greatly decreased levels of heteroreceptor revealed by autoradiography.

To assess the *in vivo* functional status of 5-HT_{1A} autoreceptors in both groups of mice, we examined their hypothermic response to challenge with the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT or its saline vehicle. The controls for the auto-KO, hetero-KO, and adult hetero-KO mice displayed a hypothermic response to 0.5 mg/kg 8-OH-DPAT consistent with previously observed values (repeated-measures ANOVA, main effect of dose for hetero-KO controls, $F_{(1,12)} = 46.979$, $p < 0.0001$; adult hetero-KO controls, $F_{(1,9)} = 33.055$, $p = 0.0003$; auto-KO controls, $F_{(1,6)} = 109.630$, $p <$

0.0001) (Fig. 4*Aii,Bii,Cii*). Consistent with a lack of functional autoreceptor, 5-HT_{1A} auto-KO mice displayed no detectable body temperature decrease in response to 8-OH-DPAT, with responses indistinguishable from the response to saline injection (repeated-measures ANOVA for effect of treatment, $F_{(1,6)} = 1.38$, $p = 0.284$) (Fig. 4*Ci*). Conversely, 5-HT_{1A} hetero-KO mice displayed a full hypothermic response to 8-OH-DPAT that was significantly different from the response to saline and indistinguishable from the hypothermic response in their controls (repeated-measures ANOVA, effect of dose in hetero-KO mice, $F_{(1,12)} = 33.10$, $p < 0.0001$; repeated-measures ANOVA, effect of group in 8-OH-DPAT-treated mice, $F_{(1,12)} = 2.486$, $p = 0.141$) (Fig. 4*A*). Likewise, 5-HT_{1A} adult hetero-KO mice displayed a response to 8-OH-DPAT that was significantly different from the response to saline and indistinguishable from the response in their matched controls (repeated-measures ANOVA, effect of dose in adult hetero-KO mice, $F_{(1,9)} = 36.216$, $p = 0.0002$; repeated-measures ANOVA effect

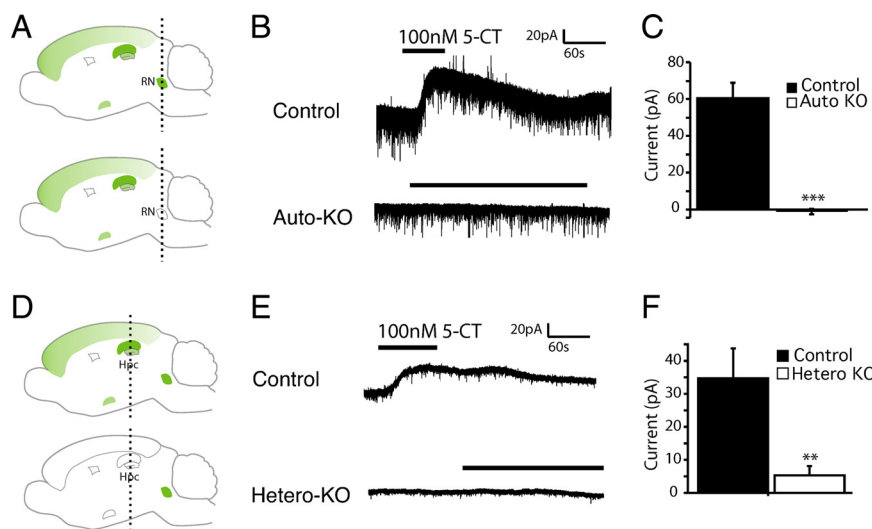


Figure 3. *A*, Schematic depicting level of sections taken for slice recordings in the dorsal raphe of auto-KO mice. *B*, Representative current traces from whole-cell recordings in the dorsal raphe of auto-KO mice and their controls in response to 5-CT. *C*, Mean outward current amplitude in response to 100 nM 5-CT was decreased in auto-KO mice. Values are mean $\pm$ SEM ($N = 12$ –24/group). *D*, Schematic depicting level of sections taken for slice recordings in CA1 of the hippocampus in hetero-KO mice. *E*, Representative current traces from whole-cell recordings in CA1 hippocampal pyramidal cells of hetero-KO mice and their controls in response to the 5-HT_{1A/7} agonist 5-CT. *F*, Mean outward current amplitude in response to 100 nM 5-CT was decreased in hetero-KO mice. Values are mean $\pm$ SEM ($N = 19$ –22/group). ** $p = 0.01$, *** $p < 0.0001$. Hpc, Hippocampus; RN, raphe nucleus.

of group in 8-OH-DPAT-treated mice, $F_{(1,10)} = 0.071$, $p = 0.795$) (Fig. 4*B*). These findings are consistent with previous literature implicating 5-HT_{1A} autoreceptors, but not heteroreceptors, in the 8-OH-DPAT-induced hypothermic response in mice (Martin et al., 1992).

These results provide both a direct *in vitro* measurement and an *in vivo* confirmation of the functional selectivity of genetic suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors, respectively, in the auto-KO, hetero-KO, and adult hetero-KO mice.

Increased serotonergic tone in mice lacking 5-HT_{1A} autoreceptors throughout life

The extracellular level of serotonin (5-HT_{ext}) is generally thought to be under the inhibitory control of both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} autoreceptors. Here we sought to determine how specific suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors throughout life was reflected at the neurochemical level in adult animals. We observed higher basal cortical 5-HT_{ext} in whole-life auto-KO mice compared to their wild-type littermates ($F_{(1,13)} = 7.79$, $p = 0.015$). However, differences between the two strains of mice in the vHPC were not significant ($F_{(1,13)} = 1.74$, $p = 0.21$) (Table 1).

To directly measure the effect of pharmacological inactivation of the 5-HT transporter in mice lacking 5-HT_{1A} autoreceptors, we challenged both auto-KO mice and their controls with the SSRI fluoxetine.

In the frontal cortex, a two-way ANOVA (treatment by genotype) on area under the curve (AUC) values revealed no significant effect of genotype ($F_{(1,28)} = 0.041$, $p = 0.841$), but a significant effect of treatment ($F_{(1,28)} = 36.984$, $p < 0.0001$). No genotype-by-treatment interaction was detected ($F_{(1,28)} = 0.02$, $p = 0.9672$).

In the vHPC, a two-way ANOVA (treatment by genotype) on AUC values revealed both a significant effect of genotype ($F_{(1,30)} = 6.82$, $p = 0.0139$), and a significant effect of treatment ($F_{(1,30)} = 58.21$, $p < 0.0001$), as well as a genotype-by-treatment interaction ($F_{(1,30)} = 6.62$, $p = 0.0153$).

Thus, as expected, both control and auto-KO mice displayed increased 5-HT_{ext} in response to acute treatment with the fluoxetine in the vHPC (Fig. 5*A,C*) and frontal cortex (Fig. 5*B,D*). Moreover, auto-KO mice displayed a proportionately larger increase in 5-HT_{ext} in response to fluoxetine than their controls in the vHPC, but not in the frontal cortex (*post hoc* for group, $p = 0.0198$) (Fig. 5*C,D*). Together, these results demonstrate that suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors throughout life results in regionally distinct increases in serotonergic tone.

Increased anxiety-like behavior in mice lacking 5-HT_{1A} autoreceptors

Mice lacking all 5-HT_{1A} receptors throughout life display reliably increased anxiety-like behavior (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998). To independently assess the role of endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors in anxiety-like behavior, we tested hetero-KO, adult hetero-KO, and auto-KO mice in conflict/anxiety paradigms: the

open field, the light/dark choice test, and the elevated plus maze.

We were unable to detect any significant impact on anxiety-like behavior by suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors beginning in early postnatal development. Specifically, we detected no differences between 5-HT_{1A} hetero-KO mice and their controls in exploration of the center of the open field (ANOVA, $F_{(1,32)} = 0.025$, $p = 0.875$), although a trend was seen for decreased exploration of the total open field (repeated-measures ANOVA, $F_{(1,32)} = 3.31$, $p = 0.078$) (Fig. 6*A*). Likewise, no differences were detected between 5-HT_{1A} hetero-KO mice and their controls in total exploration (repeated-measures ANOVA, main effect of group, $F_{(1,41)} = 0.064$, $p = 0.802$), entries into the light (ANOVA, main effect of group, $F_{(1,41)} = 0.258$, $p = 0.614$), or time in the light compartment (ANOVA, main effect of group, $F_{(1,41)} = 0.077$, $p = 0.7823$) in the light/dark choice test (Fig. 6*B*). Finally, no effects on anxiety-like behavior were detected in the elevated plus maze (data not shown).

In adult hetero-KO mice, we did not detect changes in exploration of the center of the open field (ANOVA, $F_{(1,47)} = 0.686$, $p = 0.412$), although, similar to the results in hetero-KO mice, we observed a trend for a decrease in total exploration of the open field (repeated-measures ANOVA $F_{(1,47)} = 2.74$, $p = 0.105$) (Fig. 6*C*). No differences were detected between adult hetero-KO mice and their controls in total exploration (ANOVA, $F_{(1,30)} = 0.122$, $p = 0.730$), exploration of the light (ANOVA, $F_{(1,30)} = 2.11$, $p = 0.157$), or entries into the light in the light/dark choice test (ANOVA, $F_{(1,30)} = 2.314$, $p = 0.139$) (Fig. 6*D*). Together, these results demonstrate that suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors, beginning either in early postnatal development or adulthood, is not sufficient to impact classic anxiety-like behavior. However, we cannot rule out the contribution of 5-HT_{1A} heteroreceptors to exploratory behavior, as trends for decreased exploration in the open field were seen in both groups of mice that lacked 5-HT_{1A} heteroreceptors.

Having observed that suppression of 5-HT_{1A} heteroreceptors alone, either throughout life or beginning in adulthood, was not

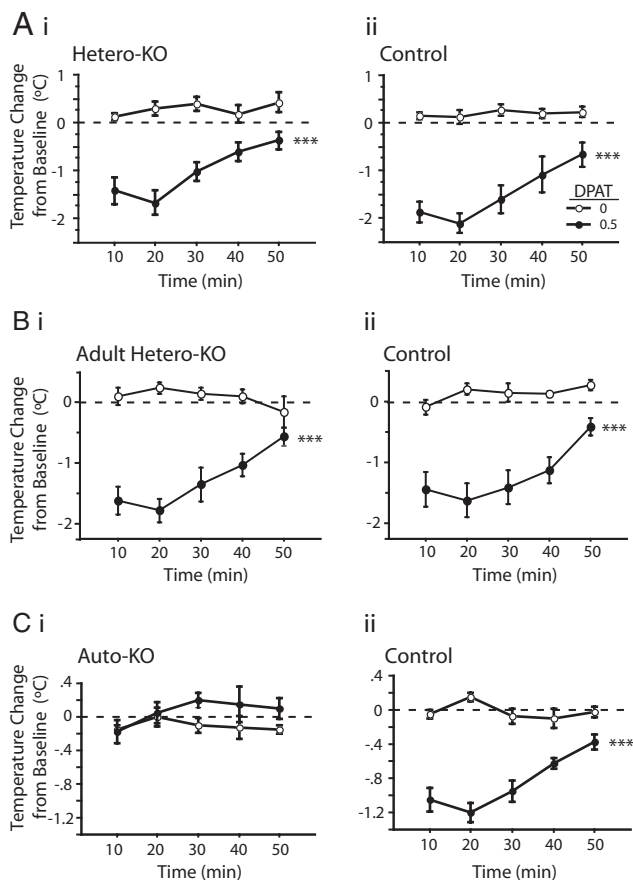


Figure 4. *A*, Hypothermic response to the 5-HT_{1A/7} agonist 8-OH-DPAT (DPAT) is normal in hetero-KO mice (*i*) and their controls (*ii*). *B*, Hypothermic response to the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT is normal in adult hetero-KO mice (*i*) and their controls (*ii*). *C*, Hypothermic response to the 5-HT_{1A} agonist 8-OH-DPAT is abolished in auto-KO mice (*i*) and normal in their controls (*ii*) ($n = 3–6$ mice/group/dose). Values are mean $\pm$ SEM. *** $p < 0.001$.

Table 1. Mean basal serotonin levels (fmol/20 μ l dialysate) $\pm$ SEM in ventral hippocampus and prefrontal cortex

	5-HT (fmol/20 μ l)	
	HPC	PFC
Control	2.8 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.1
Auto-KO	3.7 $\pm$ 0.5	3.7 $\pm$ 0.7*

HPC, ventral hippocampus; PFC, prefrontal cortex. *Value differs from control PFC, $p = 0.015$.

sufficient to impact anxiety-like behavior, we next tested whether 5-HT_{1A} autoreceptors alone might play a role in the establishment of anxiety-like behavior. Compared with their controls, auto-KO mice displayed decreased exploration of the center of the open field compared with the total (ANOVA, $F_{(1,50)} = 8.351$, $p = 0.0057$) (Fig. 6*Eii*), and a decrease in total exploration (repeated-measures ANOVA, $F_{(1,50)} = 4.786$, $p = 0.033$) (Fig. 5*Ei*). Likewise, in the light/dark choice test, auto-KO mice displayed decreased total exploration (ANOVA, $F_{(1,37)} = 19.74$, $p < 0.0001$) and fewer entries into the light compartment (ANOVA, $F_{(1,37)} = 9.19$, $p = 0.004$), but did not demonstrate a decrease in the percentage of distance in the light (ANOVA, $F_{(1,37)} = 0.017$, $p = 0.896$) (Fig. 6*F*). No effects on anxiety-like behavior were seen in the elevated plus maze (data not shown). The effects seen in the open field and light/dark test did not reflect an effect of dox treatment, as littermate control animals lacking the tTS transgene but fed the same chows throughout life displayed no differences

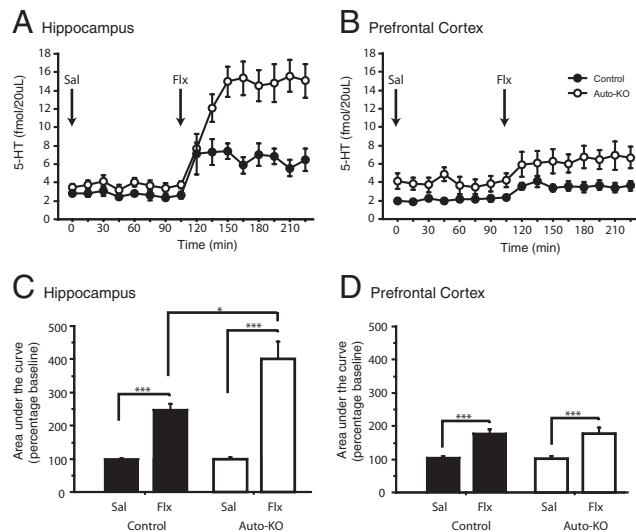


Figure 5. *A, B*, Extracellular serotonin levels measured by *in vivo* microdialysis in the vHPC (*A*) and PFC (*B*) following injection of saline (Sal; t_0) and 18 mg/kg fluoxetine (Flx; t_{105}). Values are mean $\pm$ SEM for each time point. *C, D*, Total extracellular serotonin, measured by area under the curve analysis compared with baseline, increases in the vHPC (*C*) and PFC (*D*) of both auto-KO and control mice in response to acute fluoxetine treatment. Auto-KO mice display a larger percentage increase than controls in response to fluoxetine in the vHPC but not in the PFC. Values are $\pm$ SEM ($n = 7–9$ mice/group). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

in any of the measures (data not shown). The phenotype observed in auto-KO mice is consistent with the increased anxiety-like behavior in conflict-based tasks and decreased exploration of novel environments, and is similar to what has been observed in constitutive 5-HT_{1A} KO mice on at least three genetic backgrounds (Heisler et al., 1998; Parks et al., 1998; Ramboz et al., 1998). These data suggest that endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors are necessary and sufficient for the establishment of anxiety-like behavior. Furthermore, these data suggest that normal signaling through 5-HT_{1A} heteroreceptors (with autoreceptors intact) is dispensable for the establishment of anxiety-like behavior.

Mice lacking 5-HT_{1A} heteroreceptors throughout life demonstrate increased behavioral despair in the forced-swim test

In addition to its role in anxiety, diverse evidence has linked 5-HT_{1A} receptors to depression and the response to stress. 5-HT_{1A} KO mice display altered behavior in the forced-swim test (FST) and a blunted response to antidepressants as well as increased anxiety-like behavior (Ramboz et al., 1998; Santarelli et al., 2003). However, it is unclear whether the anxiety phenotype, and other non-anxiety related phenotypes like the one seen in the FST, are impacted by the same populations of 5-HT_{1A} receptors, or whether the temporal and spatial role of 5-HT_{1A} receptors for these two behaviors are distinct.

To test directly the role of 5-HT_{1A} heteroreceptors and autoreceptors in mediating mood-related behavior that does not capture dimensions of anxiety, we first tested auto-KO mice in the forced swim test. In this test, which is often used as a pharmacological screen for antidepressant activity, active swimming and climbing are scored as mobility, which generally decreases over time. We observed that auto-KO mice displayed decrease mobility that was indistinguishable from their controls on the second day of testing (repeated-measures ANOVA, main effect of group, $F_{(1,48)} = 0.871$, $p = 0.3554$; main effect of time, $F_{(3,48)} = 23.771$, $p < 0.0001$) (Fig. 7*C*). This finding contrasted with our previ-

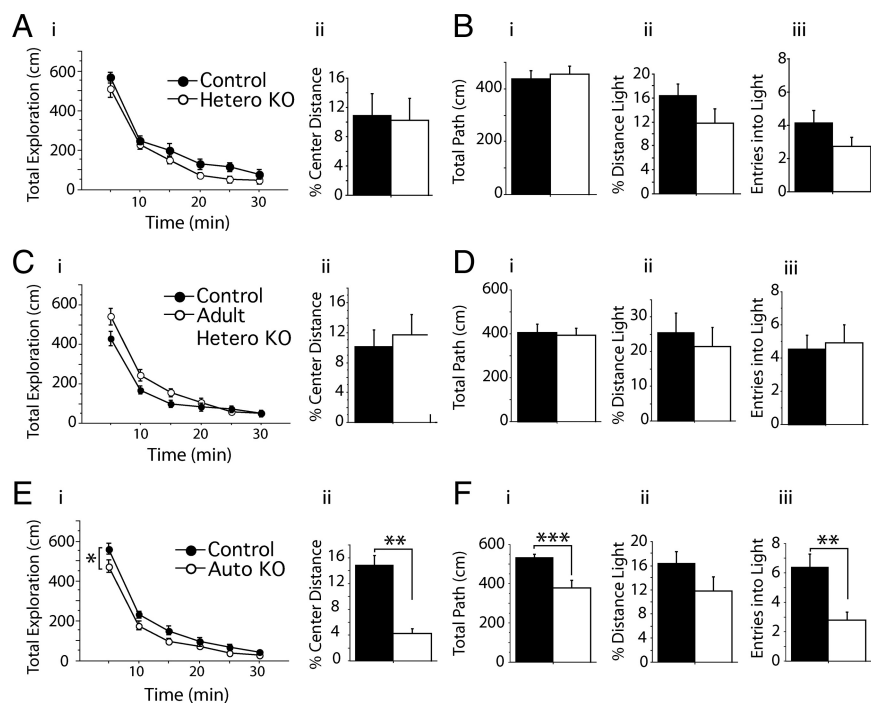


Figure 6. *A*, No group differences were detected between hetero-KO mice and their controls in the total exploration (*i*) or percentage exploration of the center (*ii*) of the open field ($n = 32$). *B*, No group differences were detected between hetero-KO mice and their controls in total exploration (*i*), percentage exploration of the light (*ii*), or entries into the light (*iii*) in the light/dark choice test ($n = 41$). *C*, No group differences were detected between adult hetero-KO mice and their controls in the total exploration (*i*) or percentage exploration of the center (*ii*) of the open field ($n = 47$). *D*, No group differences were detected between adult hetero-KO mice and their controls in total exploration (*i*), percentage exploration of the light (*ii*), or entries into the light (*iii*) in the light/dark choice test ($n = 30$). *E*, Auto-KO mice displayed decreased total exploration (*i*) and decreased percentage exploration of the center (*ii*) of the open field compared with their controls ($n = 50$). *F*, Auto-KO mice displayed less total exploration (*i*) and fewer entries into the light compartment (*iii*), but no difference in percentage exploration of the light (*ii*) compared with their controls in the light/dark choice test ($n = 37$). All values are mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

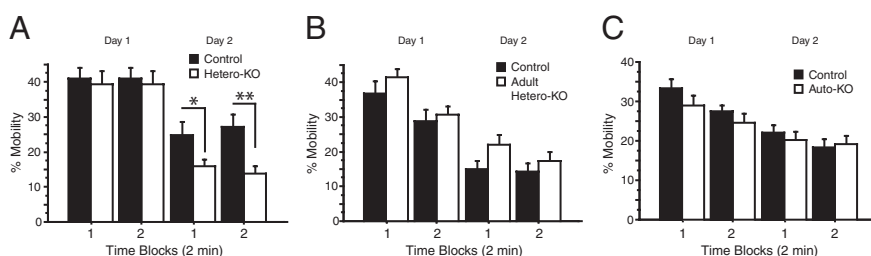


Figure 7. *A*, Hetero-KO mice displayed decreased mobility compared with their controls across a 2 d forced-swim test ($N = 48$). *B*, *C*, No group differences were detected between adult hetero-KO (*B*) or auto-KO mice (*C*) and their controls across a 2 d forced-swim test ($N = 34$ and 44 , respectively). All values are mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

ously reported effect of adult suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors (with decreased autoreceptor levels decreasing behavioral despair) (Richardson-Jones et al., 2010), and suggests that compensation occurs when 5-HT_{1A} autoreceptors are suppressed throughout life.

As suppressing autoreceptors throughout life did not alter the response to forced-swim stress, we next tested the response of hetero-KO and adult hetero-KO mice. Although hetero-KO mice were indistinguishable from their controls on the first day of testing, they displayed markedly less mobility, or more behavioral despair, on the second day of testing (repeated-measures ANOVA, group by time interaction, $F_{(3,34)} = 2.97$, $p = 0.0345$; *post hoc* for day 2, minutes 3–4 and 5–6, $p = 0.0371$ and $p = 0.0018$, respectively) (Fig. 7A). Conversely, adult suppression of 5-HT_{1A} het-

eroreceptors was not sufficient to impact behavioral despair on either day of the test (repeated-measures ANOVA, main effect of group between adult hetero-KO mice and controls, $F_{(1,44)} = 2.132$, $p = 0.1513$; group-by-time interaction, $F_{(3,44)} = 0.570$, $p = 0.6357$) (Fig. 7B). This demonstrates that 5-HT_{1A} heteroreceptors act developmentally to establish the circuitry underlying this behavior, and establishes a dissociation between the roles of 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors in modulating mood-related anxious and nonanxious behavior, respectively.

Discussion

Independent suppression of endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors

The 5-HT_{1A} receptor exists as two distinct populations in the brain (autoreceptors and heteroreceptors) that, individually, could impact the circuitry underlying mood and anxiety in both development and/or adulthood. We accomplished independent manipulation of 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors populations using the tTS/tetO system (Mallo et al., 2003; Richardson-Jones et al., 2010). This system provides a number of advances over classic KO and previous transgenic technology. First, it allows for spatial and temporal specificity, neither of which are possible using constitutive KO mice. Given the hypothesized difference in the roles of the 5-HT system in development and adulthood, temporal specificity was a primary goal (Ansorge et al., 2007, 2008). Second, this genetic strategy allows for examination of the role of endogenous receptors; unlike previous transgenic overexpression strategies, the tTS/tetO strategy relies on suppressible gene expression from the endogenous promoter elements. Moreover, we have recently demonstrated that this system can be generalized to other genes (Tanaka et al., 2010).

Establishment of 5-HT tone

In agreement with the observation that the firing activity of serotonergic neurons and consequently the release of 5-HT is under tonic inhibitory control by somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors (Haddjeri et al., 2004), constitutive deletion of the 5-HT_{1A} receptor increases basal extracellular 5-HT level in some brain structures (He et al., 2001; Parsons et al., 2001). This is consistent with data obtained here in auto-KO mice (Table 1). Nevertheless, the effect observed here is region-dependent, as basal 5-HT_{ext} was increased in the frontal cortex, but not in the vHPC of auto-KO mice. Several hypotheses may explain such differences. Regional differences in 5-HT reuptake sites in mouse brain could account for these neurochemical observations. Autoradiographic studies have reported a lower density of serotonin transporter (SERT) in

the frontal cortex compared with the hippocampus in constitutive 5-HT_{1A} KO mice (Ase et al., 2001). Interestingly, SERT downregulation is also observed in double 5-HT_{1A/1B} KO mice (Guilloux et al., 2011). Thus, the increase in 5-HT_{ext} observed in the frontal cortex (but not in the vHPC) of auto-KO mice may be attributed to a specific reduction of SERT expression in the frontal cortex. A second observation to be explored with regard to the present results is the marked difference in the intrinsic organization of 5-HT innervations. The frontal cortex is primarily innervated by the dorsal raphe nucleus (DRN), whereas the hippocampus is mostly innervated by the median raphe nucleus (MRN) (Azmitia and Segal, 1978; Imai et al., 1986; McQuade and Sharp, 1997). It is thus possible that the enhancement of basal extracellular 5-HT levels specifically in the frontal cortex in auto-KO mice resulted from a greater effect of autoreceptor deletion on the release of 5-HT from DRN compared with the MRN.

The magnitude of 5-HT release in the presence of transporter blockade also displayed a region-dependent difference. As expected, upon challenge with fluoxetine, 5-HT_{ext} was increased in both control and auto-KO mice (Fig. 5). However, the magnitude of the response to SSRI in auto-KO mice was greater in the vHPC than in the frontal cortex. These neurochemical effects markedly contrast with levels observed at baseline. Because of the greater density of 5-HT uptake sites in the hippocampus in mice [compared with the frontal cortex (Ase et al., 2001)], SSRIs are expected to cause a greater increase in 5-HT_{ext} levels in the hippocampus. Indeed, this was observed in the present study. In contrast with this assumption, fluoxetine (Malagie et al., 1995) and paroxetine (Romero and Artigas, 1997) have been shown to increase 5-HT_{ext} to a comparable extent in the frontal cortex and hippocampus of wild-type mice. These data can be interpreted in light of the distinct roles that 5-HT_{1A} heteroreceptors in the frontal cortex are thought to play in the negative feedback inhibition of the raphe. Specifically, frontal cortex forebrain heteroreceptors are thought to participate in feedback via polysynaptic connections to the raphe, whereas hippocampal heteroreceptors are not (Ceci et al., 1994; Assié and Koek, 1996; Casanovas et al., 1999; Hajós et al., 1999). Our results in the auto-KO mouse suggest that autoreceptor feedback in response to fluoxetine is stronger in raphe projections to hippocampus than frontal cortex, since heteroreceptor-based negative feedback plays a substantial role solely in frontal cortex.

Alternatively, the heterogeneous elevation of 5-HT_{ext} induced by fluoxetine in auto-KO mice could be due to changes in the sensitivity of terminal 5-HT_{1B} autoreceptors. Such changes have been detected in constitutive 5-HT_{1A} KO mice (Boutrel et al., 2002).

Establishment of anxiety-like behavior

Mice lacking all 5-HT_{1A} receptors (both autoreceptors and heteroreceptors) throughout life display increased anxiety-like behavior (Ramboz et al., 1998). Subsequent gain-of-function experiments, in which 5-HT_{1A} receptors were ectopically overexpressed in forebrain areas such as the cortex and striatum (in the absence of autoreceptors), reversed the increased anxiety behavior in 5-HT_{1A} KO mice (Gross et al., 2002). These findings led to the theory that endogenous 5-HT_{1A} heteroreceptors in the forebrain control the normal establishment of anxiety-like behavior (Gross and Hen, 2004; Akimova et al., 2009; Goodfellow et al., 2009; Zhang et al., 2010). A separate body of literature has implicated serotonergic tone during postnatal development in determining anxiety-like behavior, with whole-life or early postnatal

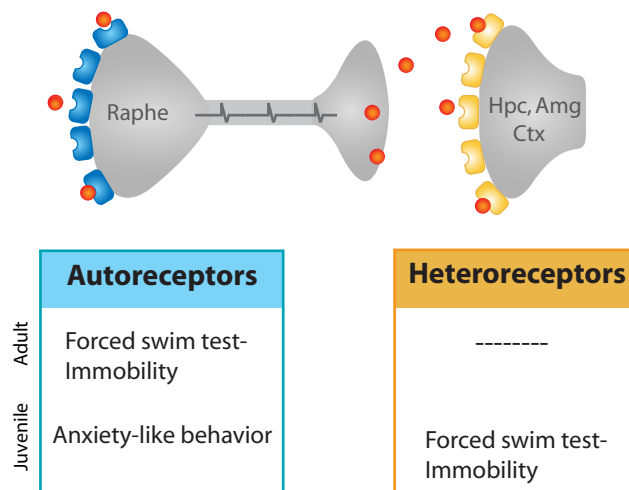


Figure 8. Schematic depicting predicted behavioral roles of endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors and heteroreceptors in the juvenile and adult mouse. Raphe autoreceptors are blue and forebrain heteroreceptors in regions, including the hippocampus (Hpc), amygdala (Amg), and cortex (Ctx), are yellow. Endogenous autoreceptors, which limit levels of serotonin released by raphe neurons, affect anxiety-related circuitry in development or circuitry mediating forced-swim test behavior in the adult. Endogenous heteroreceptors, which exert inhibitory control over certain forebrain neurons, affect forced-swim test behavior but not anxiety in the juvenile.

blockade of the 5-HT transporter increasing anxiety in rodents (Lira et al., 2003; Ansorge et al., 2004; Jennings et al., 2006). As one of the major modulators of serotonergic tone, the 5-HT_{1A} autoreceptors may likewise participate in the developmental establishment of anxiety. Thus, both 5-HT_{1A} autoreceptors and 5-HT_{1A} heteroreceptors are well positioned to affect the circuitry underlying anxiety-like behavior.

Here we demonstrate, using a loss-of-function approach, that suppression of endogenous 5-HT_{1A} autoreceptors throughout life is sufficient to increase anxiety in the adult. Conversely, loss of endogenous heteroreceptors beginning either in the early postnatal period or in adulthood is not sufficient to impact anxiety-like behavior. These results suggest that the anxious-like phenotype of the 5-HT_{1A} KO mouse likely results from increased serotonergic neuron excitability during development. Thus, our results suggest a new framework for interpreting the role of the 5-HT_{1A} receptor in the developmental programming of anxiety behavior that de-emphasizes the role of the heteroreceptors in favor of autoreceptor-mediated serotonergic tone.

The results presented here by no means discount the role of serotonergic signaling in the developing forebrain in establishing anxiety circuitry. Indeed, forebrain neurons undergo a shift in their response to 5-HT during this time that corresponds to differential coupling of excitatory and inhibitory receptor subtypes (Béique et al., 2004; Goodfellow et al., 2009). Thus, the serotonergic system can impact anxiety circuitry both at the level of neurotransmitter release and through the relative balance of inhibitory and excitatory response in the developing forebrain. However, using our loss-of-function approach, we conclude that, under normal conditions, endogenous 5-HT_{1A} forebrain heteroreceptors are not the primary mediators of 5-HT's effect on developing anxiety circuitry. Whether these receptors might play a more prominent role under adverse conditions (i.e., with higher 5-HT as result of stress) is beyond the scope of these experiments but remains an intriguing hypothesis (Goodfellow et al., 2009).

Finally, our results highlight the importance of distinguishing between endogenous functions of a receptor (often most clearly revealed through loss-of-function manipulations) and the ability

of a receptor to ectopically impact circuits (often most clearly revealed through gain-of-function manipulations) (Gross et al., 2002; Kusserow et al., 2004). Recent evidence suggests that the 5-HT_{1A} receptor has great utility in pharmacogenomic experiments designed to probe circuit function, but the phenotypes conferred by such manipulations should not be confused with the endogenous role of the receptor (Tsetsenis et al., 2007; Audero et al., 2008).

Behavioral effects of heteroreceptor suppression

In contrast to the widely recognized antidepressant effect of increasing 5-HT in the adult, several pieces of evidence suggest that increased 5-HT tone in early development can increase adult depression as well as anxiety. Although antidepressant drugs that increase extracellular 5-HT levels reliably decrease immobility in adult rodents in the forced-swim test, mice lacking 5-HT transporter activity either throughout life or only during a postnatal developmental period show increased immobility in this test (Lira et al., 2003; Wellman et al., 2007). Moreover, mice lacking enzymes necessary for the synthesis of 5-HT throughout life (which display lower levels of 5-HT_{ext}) show decreased immobility in the forced-swim test in adulthood (Savelieva et al., 2008). Thus, the circuitry underlying responsiveness in the forced swim test response can be influenced by extracellular 5-HT levels during development. Indeed, it appears that manipulations of extracellular 5-HT levels during postnatal development result in behaviors that are directly opposite to those caused by pharmacological manipulation of serotonin levels with SSRIs in adult animals.

Here we demonstrate that mice lacking 5-HT_{1A} autoreceptors throughout life and displaying increased anxiety-like behavior nevertheless display no differences from their controls in forced-swim behavior in adulthood. In contrast, we demonstrate that mice lacking 5-HT_{1A} heteroreceptors beginning in development display decreased mobility, or increased behavioral despair, in adulthood (Fig. 8). This phenotype was not observed when heteroreceptor suppression was initiated in adulthood, suggesting that serotonergic signaling in the forebrain during development stably impacts the circuitry underlying the behavioral response to forced-swim stress without affecting conflict-based anxiety measures.

Together, our findings demonstrate a functional dissociation across both spatial (raphe vs forebrain) and temporal (development vs adulthood) domains within a single receptor subtype, and may be relevant to the partially overlapping set of genes and circuitry underlying anxiety- and depression-related behavior.

References

- Adriaan Bouwknecht J, Olivier B, Paylor RE (2007) The stress-induced hyperthermia paradigm as a physiological animal model for anxiety: a review of pharmacological and genetic studies in the mouse. *Neurosci Biobehav Rev* 31:41–59.
- Akimova E, Lanzenberger R, Kasper S (2009) The serotonin-1A receptor in anxiety disorders. *Biol Psychiatry* 66:627–635.
- Ansoorge MS, Zhou M, Lira A, Hen R, Gingrich JA (2004) Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice. *Science* 306:879–881.
- Ansoorge MS, Hen R, Gingrich JA (2007) Neurodevelopmental origins of depressive disorders. *Curr Opin Pharmacol* 7:8–17.
- Ansoorge MS, Morelli E, Gingrich JA (2008) Inhibition of serotonin but not norepinephrine transport during development produces delayed, persistent perturbations of emotional behaviors in mice. *J Neurosci* 28:199–207.
- Ase AR, Reader TA, Hen R, Riad M, Descarries L (2001) Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout. *J Neurochem* 78:619–630.
- Assié MB, Koek W (1996) Possible in vivo 5-HT reuptake blocking properties of 8-OH-DPAT assessed by measuring hippocampal extracellular 5-HT using microdialysis in rats. *Br J Pharmacol* 119:845–850.
- Audero E, Coppi E, Mlinar B, Rossetti T, Caprioli A, Banchaabouchi MA, Corradetti R, Gross C (2008) Sporadic autonomic dysregulation and death associated with excessive serotonin autoinhibition. *Science* 321:130–133.
- Azmithia EC, Segal M (1978) An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 179:641–667.
- Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* 38:1083–1152.
- Beck SG, Choi KC, List TJ (1992) Comparison of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated hyperpolarization in CA1 and CA3 hippocampal pyramidal cells. *J Pharmacol Exp Ther* 263:350–359.
- Beck SG, Pan YZ, Akanwa AC, Kirby LG (2004) Median and dorsal raphe neurons are not electrophysiologically identical. *J Neurophysiol* 91:994–1005.
- Béique JC, Campbell B, Perring P, Hamblin MW, Walker P, Mladenovic L, Andrade R (2004) Serotonergic regulation of membrane potential in developing rat prefrontal cortex: coordinated expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₇ receptors. *J Neurosci* 24:4807–4817.
- Bert B, Fink H, Hörtnagl H, Veh RW, Davies B, Theuring F, Kusserow H (2006) Mice over-expressing the 5-HT_{1A} receptor in cortex and dentate gyrus display exaggerated locomotor and hypothermic response to 8-OH-DPAT. *Behav Brain Res* 167:328–341.
- Boutrel B, Monaca C, Hen R, Hamon M, Adrien J (2002) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice. *J Neurosci* 22:4686–4692.
- Casanovas JM, Hervás I, Artigas F (1999) Postsynaptic 5-HT_{1A} receptors control 5-HT release in the rat medial prefrontal cortex. *Neuroreport* 10:1441–1445.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, Harrington H, McClay J, Mill J, Martin J, Braithwaite A, Poulton R (2003) Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science* 301:386–389.
- Ceci A, Baschiroto A, Borsini F (1994) The inhibitory effect of 8-OH-DPAT on the firing activity of dorsal raphe serotonergic neurons in rats is attenuated by lesion of the frontal cortex. *Neuropharmacology* 33:709–713.
- Crawford LK, Craig CP, Beck SG (2010) Increased intrinsic excitability of lateral wing serotonin neurons of the dorsal raphe: a mechanism for selective activation in stress circuits. *J Neurophysiol* 103:2652–2663.
- David DJ, Klemm HC, Holick KA, Saxe MD, Mendez I, Santarelli L, Craig DA, Zhong H, Swanson CJ, Hegde LG, Ping XI, Dong D, Marzabadi MR, Gerald CP, Hen R (2007) Efficacy of the MCHR1 antagonist N-[3-(1-[(4-(3,4-difluorophenoxy)phenyl)methyl](4-piperidyl))-4-methylphenyl]-2-methylpropanamide (SNAP 94847) in mouse models of anxiety and depression following acute and chronic administration is independent of hippocampal neurogenesis. *J Pharmacol Exp Ther* 321:237–248.
- Davidson JR (2009) First-line pharmacotherapy approaches for generalized anxiety disorder. *J Clin Psychiatry* 70 [Suppl 2]:25–31.
- Fakra E, Hyde LW, Gorka A, Fisher PM, Muñoz KE, Kimak M, Halder I, Ferrell RE, Manuck SB, Hariri AR (2009) Effects of HTR1A C(-1019)G on amygdala reactivity and trait anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 66:33–40.
- Franklin KBJ, Paxinos G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic.
- Gartside SE, Umbers V, Hajós M, Sharp T (1995) Interaction between a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist and an SSRI in vivo: effects on 5-HT cell firing and extracellular 5-HT. *Br J Pharmacol* 115:1064–1070.
- Goodfellow NM, Benekareddy M, Vaidya VA, Lambe EK (2009) Layer II/III of the prefrontal cortex: inhibition by the serotonin 5-HT_{1A} receptor in development and stress. *J Neurosci* 29:10094–10103.
- Gross C, Hen R (2004) The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* 5:545–552.
- Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002) Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 416:396–400.
- Guiard BP, David DJ, Deltheil T, Chenu F, Le Maître E, Renoir T, Leroux-Nicollet I, Sokoloff P, Lanfumey L, Hamon M, Andrews AM, Hen R, Gardier AM (2008) Brain-derived neurotrophic factor-deficient mice

- exhibit a hippocampal hyperserotonergic phenotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:79–92.
- Guilloux JP, David DJ, Xia L, Nguyen HT, Rainer Q, Guiard BP, Reperant C, Deltheil T, Toth M, Hen R, Gardier AM (2011) Characterization of 5-HT_{1A}/1B^{-/-} mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology*. Advance online publication. Retrieved April 6, 2011. doi:10.1016/J.neuropharm.2011.02.009.
- Haddjeri N, Lavoie N, Blier P (2004) Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT(1A) autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology* 29:1800–1806.
- Hajós M, Hajós-Korcsok E, Sharp T (1999) Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol* 126:1741–1750.
- Hamon M, Gozlan H, el Mestikawy S, Emerit MB, Bolaños F, Schechter L (1990) The central 5-HT_{1A} receptors: pharmacological, biochemical, functional, and regulatory properties. *Ann N Y Acad Sci* 600:114–129; discussion 129–131.
- He M, Sibille E, Benjamin D, Toth M, Shippenberg T (2001) Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res* 902:11–17.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, Bajwa P, Parsons LH, Tecott LH (1998) Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15049–15054.
- Imai H, Steindler DA, Kitai ST (1986) The organization of divergent axonal projections from the midbrain raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 243:363–380.
- Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RM, Benson MA, Olverman HJ, Hastie ND, Harmar AJ, Shen S, Sharp T (2006) Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmission. *J Neurosci* 26:8955–8964.
- Kirby LG, Pernar L, Valentino RJ, Beck SG (2003) Distinguishing characteristics of serotonin and non-serotonin-containing cells in the dorsal raphe nucleus: electrophysiological and immunohistochemical studies. *Neuroscience* 116:669–683.
- Kirby LG, Freeman-Daniels E, Lemos JC, Nunan JD, Lamy C, Akanwa A, Beck SG (2008) Corticotropin-releasing factor increases GABA synaptic activity and induces inward current in 5-hydroxytryptamine dorsal raphe neurons. *J Neurosci* 28:12927–12937.
- Kusserow H, Davies B, Hörtnagl H, Voigt I, Stroh T, Bert B, Deng DR, Fink H, Veh RW, Theuring F (2004) Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 129:104–116.
- Le François B, Czesak M, Steubl D, Albert PR (2008) Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* 55:977–985.
- Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* 23:8788–8799.
- Lemos JC, Pan YZ, Ma X, Lamy C, Akanwa AC, Beck SG (2006) Selective 5-HT receptor inhibition of glutamatergic and GABAergic synaptic activity in the rat dorsal and median raphe. *Eur J Neurosci* 24:3415–3430.
- Lira A, Zhou M, Castanon N, Ansorge MS, Gordon JA, Francis JH, Bradley-Moore M, Lira J, Underwood MD, Arango V, Kung HF, Hofer MA, Hen R, Gingrich JA (2003) Altered depression-related behaviors and functional changes in the dorsal raphe nucleus of serotonin transporter-deficient mice. *Biol Psychiatry* 54:960–971.
- Lo Iacono L, Gross C (2008) Alpha-Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II contributes to the developmental programming of anxiety in serotonin receptor 1A knock-out mice. *J Neurosci* 28:6250–6257.
- Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Gardier AM (1995) Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 286:213–217.
- Mallo M, Kanzler B, Ohnemus S (2003) Reversible gene inactivation in the mouse. *Genomics* 81:356–360.
- Martin KF, Phillips I, Hearson M, Prow MR, Heal DJ (1992) Characterization of 8-OH-DPAT-induced hypothermia in mice as a 5-HT_{1A} autoreceptor response and its evaluation as a model to selectively identify antidepressants. *Br J Pharmacol* 107:15–21.
- Mayford M, Bach ME, Huang YY, Wang L, Hawkins RD, Kandel ER (1996) Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274:1678–1683.
- McQuade R, Sharp T (1997) Functional mapping of dorsal and median raphe 5-hydroxytryptamine pathways in forebrain of the rat using microdialysis. *J Neurochem* 69:791–796.
- Nemeroff CB (2002) Comorbidity of mood and anxiety disorders: the rule, not the exception? *Am J Psychiatry* 159:3–4.
- Oberlander TF, Gingrich JA, Ansorge MS (2009) Sustained neurobehavioral effects of exposure to SSRI antidepressants during development: molecular to clinical evidence. *Clin Pharmacol Ther* 86:672–677.
- Olivier JD, Van Der Hart MG, Van Swelm RP, Dederen PJ, Homberg JR, Cremers T, Deen PM, Cuppen E, Cools AR, Ellenbroek BA (2008) A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders. *Neuroscience* 152:573–584.
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, Toth M (1998) Increased anxiety of mice lacking the serotonin 1A receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10734–10739.
- Parsons LH, Kerr TM, Tecott LH (2001) 5-HT(1A) receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission. *J Neurochem* 77:607–617.
- Pittenger C, Huang YY, Paletzki RF, Bourthouladze R, Scanlin H, Vronskaia S, Kandel ER (2002) Reversible inhibition of CREB/ATF transcription factors in region CA1 of the dorsal hippocampus disrupts hippocampus-dependent spatial memory. *Neuron* 34:447–462.
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, Blier P, Mendelsohn M, Mann JJ, Brunner D, Hen R (1998) Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14476–14481.
- Ressler KJ, Nemeroff CB (2000) Role of serotonergic and noradrenergic systems in the pathophysiology of depression and anxiety disorders. *Depress Anxiety* 12 [Suppl 1]:2–19.
- Riad M, Garcia S, Watkins KC, Jodoin N, Doucet E, Langlois X, el Mestikawy S, Hamon M, Descarries L (2000) Somatodendritic localization of 5-HT_{1A} and preterminal axonal localization of 5-HT_{1B} serotonin receptors in adult rat brain. *J Comp Neurol* 417:181–194.
- Richardson-Jones JW, Craig CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010) 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* 65:40–52.
- Romero L, Artigas F (1997) Preferential potentiation of the effects of serotonin uptake inhibitors by 5-HT_{1A} receptor antagonists in the dorsal raphe pathway: role of somatodendritic autoreceptors. *J Neurochem* 68:2593–2603.
- Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederhise G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR*D report. *Am J Psychiatry* 163:1905–1917.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R (2003) Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 301:805–809.
- Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q, Cullinan E, Lanthorn TH (2008) Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. *PLoS One* 3:e3301.
- Tanaka KF, Ahmari SE, Leonardo ED, Richardson-Jones JW, Budreck EC, Scheffele P, Sugio S, Inamura N, Ikenaka K, Hen R (2010) Flexible Accelerated STOP Tetracycline Operator-knockin (FAST): a versatile and efficient new gene modulating system. *Biol Psychiatry* 67:770–773.
- Tsetsenis T, Ma XH, Lo Iacono L, Beck SG, Gross C (2007) Suppression of conditioning to ambiguous cues by pharmacogenetic inhibition of the dentate gyrus. *Nat Neurosci* 10:896–902.
- Wellman CL, Izquierdo A, Garrett JE, Martin KP, Carroll J, Millstein R, Lesch KP, Murphy DL, Holmes A (2007) Impaired stress-coping and fear extinction and abnormal corticolimbic morphology in serotonin transporter knock-out mice. *J Neurosci* 27:684–691.
- Zhang J, Huang XY, Ye ML, Luo CX, Wu HY, Hu Y, Zhou QG, Wu DL, Zhu LJ, Zhu DY (2010) Neuronal nitric oxide synthase alteration accounts for the role of 5-HT_{1A} receptor in modulating anxiety-related behaviors. *J Neurosci* 30:2433–2441.

ARTICLE 3: Importance des interaction entre des auto- 5-HT_{1A} et hétéro-récepteurs 5-HT_{2A} dans la maintenance du rétrocontrôle négatif sur le système sérotoninergique

Gaël Quesseveur*, **Hai Thanh Nguyen***, Indira David, Lin Xia, Miklos Toth, Jay Gingrich, Alain M. Gardier, Jean-Philippe Guilloux, Denis J.P. David, Bruno P. Guiard

En préparation.

Résumé : Notre recherche consiste à comprendre le rôle des récepteurs 5-HT_{2A} dans la régulation du système sérotoninergique central en conditions basales ou en réponses à un ISRS, notamment lors de l'inactivation du récepteur 5-HT_{1A}. Pour cela nous avons appliqué une approche pharmacogénétique utilisant les souris mutantes KO5-HT_{1A} $-/-$ et 5-HT_{2A} $-/-$.

Principaux résultats

- Les souris 5-HT_{2A} $-/-$ présentent une augmentation significative de l'activité électrique des neurones 5-HT laissant entrevoir un rôle inhibiteur de ce récepteur dans le contrôle du système sérotoninergique. En accord avec cette hypothèse un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (le DOI) a réduit l'activité électrique des neurones 5-HT tandis que ces effets ont été atténués par la lésion du système noradrénergique.

- L'effet inhibiteur d'un ISRS, le escitalopram a persisté chez des souris mutantes privées de manière constitutive du récepteur 5-HT_{1A}. Cet effet inhibiteur a été reversé par un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A} (le MDL100907). De plus l'effet inhibiteur du DOI sur l'activité électrique des neurones 5-HT a été potentialisé chez les souris KO 5-HT_{1A} laissant entrevoir une hypersensibilité du récepteur 5-HT_{2A} chez ces mutants.

- Au contraire, la délétion du récepteur 5-HT_{2A} se traduit par une hypersensibilité de l'autorécepteur 5-HT_{1A} évaluée en comportement (hypothermie), électrophysiologie et microdialyse intracérébrale.

Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontre de façon surprenante que l'effet inhibiteur des ISRS et plus particulièrement du escitalopram persiste chez des souris présentant une inactivation des autorécepteurs 5-HT_{1A}. Il semblerait que les hétérorécepteurs 5-HT_{2A} puissent pallier à cette absence d'autorécepteur de manière à maintenir un contrôle inhibiteur sur le système sérotoninergique. Au contraire, l'absence de récepteurs 5-HT_{2A} se traduit par une augmentation de la sensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1A} mettant en évidence une interaction fonctionnelle à distance entre ces deux récepteurs inhibiteurs.

ABSTRACT

Selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRIs) indirectly stimulate multiple 5-HT receptors by enhancing its extracellular levels in the synaptic cleft. Although the role of 5-HT_{1A} receptor in the control of the serotonergic tone has been extensively studied, that of 5-HT_{2A} receptor attracted less attention. The present study examined the role of 5-HT_{2A} receptor in the regulation of the serotonergic system and its functional interactions with 5-HT_{1A} autoreceptor by using a combined pharmacological and genetic approach. In 5-HT_{2A}^{-/-} knock-out (KO) mice, a significant increase in the firing activity of dorsal raphe 5-HT neurons was observed suggesting a tonic inhibitory influence of this receptor upon serotonergic neurons. Consistent with this hypothesis, the preferential 5-HT_{2A} receptor agonist DOI reduced the firing activity of 5-HT neurons in wild-type mice, while these effects were completely blunted in 5-HT_{2A}^{-/-} mutants. Interestingly, in wild-type mice the lesion of the noradrenergic system attenuated the inhibitory effects of DOI on 5-HT neurons. We then showed that the inhibitory effects of the SSRI escitalopram currently described in wild-type mice, persisted in 5-HT_{1A}^{-/-} KO mice, probably in relation with hypersensitivity of 5-HT_{2A} receptor in these mutants. Finally, we investigated the functional status of 5-HT_{1A} receptor in 5-HT_{2A}^{-/-} KO mice. The genetic inactivation of 5-HT_{2A} receptor resulted in a hypersensitivity of 5-HT_{1A} autoreceptor as shown in behavioural, electrophysiological and neurochemical experiments. This study clearly indicates that 5-HT_{1A} auto- and 5-HT_{2A} hetero-receptors act in concert to maintain an inhibitory influence on the serotonergic system, particularly in response to increased levels of endogenous 5-HT, the absence of one receptor being compensated by an up-regulation of the other.

Keywords: Serotonin, receptor, drug interaction, mice, agonist, antagonist.

INTRODUCTION

Selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRIs) are indirect-acting 5-HT receptor agonists since they block the reuptake of 5-HT, increase 5-HT extracellular concentrations in various brain regions and finally activate multiple 5-HT receptor types. In the central nervous system (CNS), 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors are the target for drugs effective in the treatment of psychiatric disorders such as major depression and schizophrenia respectively (Ghanbari *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2011). Both receptors draw particular attention because of their close association with negative feedback on serotonergic neurons in response to SSRIs (Gardier *et al.*, 1996; Celada *et al.*, 2004). For example, it is well documented that acute administration of SSRIs in rodents reduce the activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe (DR) whereas this inhibitory response can be prevented or reversed by the 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} receptor antagonists WAY100635 or MDL100907 (Boothman *et al.*, 2003; El Mansari *et al.*, 2005; El Mansari et Blier, 2005). Long-term treatment with SSRIs produces desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors both in humans and in rats (Blier and Ward, 2003) and enhances the function of 5-HT_{2A} receptors (Cadogan *et al.*, 1993) suggesting that an imbalance may exist between these receptors in response to antidepressant treatments as previously observed in depressed patients (Borsini, 1994). At the neurochemical and behavioral levels, 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} receptor antagonists potentiate the increase in extracellular levels of 5-HT (Gobert *et al.*, 1997; Dawson *et al.*, 2002; Guilloux *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2006; Silver *et al.*, 2011) and the antidepressant-like activity of SSRIs in rodents (Marek *et al.* 2005; Muraki *et al.*, 2008). From these data, it is thus conceivable that activation of 5-HT_{2A} receptors may attenuate the therapeutic effects of SSRIs even in absence of 5-HT_{1A} autoreceptors. To our knowledge, this question has not been directly addressed.

A number of studies have examined the interactions between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors by using pharmacological approaches (Li *et al.*, 1992; Reissig *et al.*, 2008; Naumenko *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Electrophysiological evidence for a functional interaction between both receptors in the rat prefrontal cortex has been reported (El Mansari *et al.*, 2005; Stark *et al.*, 2007; Ghanbari *et al.*, 2009). For instance, the iontophoretic application of the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-hydroxy-2-

(din-propylamino) tetralin hydrochloride (8-OH-DPAT) produced a current-dependant suppression of the basal firing rate of pyramidal cells and the selective blockade of 5-HT_{2A} receptor potentiated 8-OHDPAT's suppressant action (Ashby *et al.*, 1994). Another example comes from the observation that the 5-HT_{2A} receptor agonist 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI) increases the plasma concentrations of ACTH and this effect is enhanced by 8-OH-DPAT (Li *et al.* 1992). On the other hand, 5-methoxy-dimethyltryptamine-induced head twitching (Darmani *et al.* 1990; Egashira *et al.*, 2008), an effect mediated by central 5-HT_{2A} receptor (Popova and Kulikov, 1995; Fantegrossi *et al.*, 2010; Dougherty and Aloyo, 2011) is inhibited by 8-OH-DPAT (Darmani *et al.* 1990). Together, these data support the notion of interplay between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors but the nature of such interaction remains poorly described and may depend on the brain(s) region(s) studied.

This study used electrophysiological and neurochemical experiments to further examine the reciprocal interactions between 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors by using deficient mice for these receptors or wild-type mice treated either with the selective agonist/antagonist of 5-HT_{1A} (8-OH-DPAT/WAY100635) or 5-HT_{2A} (DOI/MDL100907) receptors.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male wild-type (WT) and 5-HT_{1A}(-/-)/5-HT_{2A}(-/-) receptors deficient mice, 6–8 weeks old, weighing 24–32 g, were used in this study. Mice maintained at Weill Medical College of Cornell University were transferred to our laboratory in order to grow a stable colony in the animal facility of the Faculté de Pharmacie, University of Paris 11, France. Experimental animals were housed in our animal care facility in groups of 3–6 and kept under standard conditions (room temperature of 22–23°C, 12:12 light–dark cycle, free access to food and water). Mice were tested between 9.00 a.m. and 5.00 p.m. during the light phase. Procedures were conducted in conformity with the institutional guidelines in compliance with national policy (Council directive #87–848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions #005037 to A.M. Gardier).

Drugs and administration

Escitalopram oxalate was provided by Lundbeck (Denmark) and dissolved in NaCl 0.9% NaCl/NaCl/dimethylsulfoxide (80/20). It was administered by the subcutaneous (s.c.) route at a dose of 4 mg/kg, which is known to produce an increase in extracellular levels of 5-HT, without affect dopaminergic and noradrenergic neurotransmissions in the frontal cortex (Nguyen *et al.*, 2011, *BJP*). 1,2,5-Dimethoxy-4-iodoamphetamine (DOI); alpha-(2,3-dimethoxyphenyl)-1-(2-(4-fluorophenylethyl))-4-piperidine methanol (MDL 100907); 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin hydrobromide (8-OHDPAT) and (N-{2-[4 (2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-N-(2-pyridinyl) cyclohexanecarboxamide tri-hydrochloride (WAY100635) were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and dissolved in distilled water or beta-cyclodextrin. These pharmacological compounds were administered subcutaneously at the doses of 1–10 mg/kg (DOI); 2 mg/kg (MDL100907); 0.1 mg/kg (8-OHDPAT) and 0.5 mg/kg (WAY100635). N-(2-Chloroethyl)-N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP-4) was dissolved in NaCl (0.9%) and injected intraperitoneally at the dose 25 and 50 mg/kg.

Body temperature

Body temperature was assessed intrarectally, using a lubricated probe (BIO-BRET-3) inserted approximately 2 cm and monitored (BIO-TK9882, BIOSEB, Vitrolles, France). Three baseline body temperature measurements were taken to control that stress induces hyperthermia (Supplemental table) according to Van der Heyden *et al.*, (1997). Ten minutes after the third baseline measurement, animals received 8-OHDPAT (100 µg/kg; s.c.) and body temperature was measured 10 min after the injection.

In-vivo electrophysiological recordings

Mice were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg i.p) and placed in a stereotaxic frame (using the David Kopf mouse adaptor) with the skull positioned horizontally. The extracellular recordings were performed using single glass micropipettes (R&D Scientific Glass, USA) for recordings in the dorsal raphe (DR). Micropipettes were preloaded with fibre glass strands to promote capillary filling with a 2 M NaCl solution. Single glass micropipettes pulled on a pipette puller (Narishige, Japan) with impedances ranging from 2.5 to 5 mV, were

positioned 0.2–0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered into the DR, usually attained at a depth of 2.5–3.5 mm from the brain surface. The DR 5-HT neurons were then identified according to the following criteria : a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate and a long duration, positive action potential.

Microdialysis procedure

Mice anaesthetized with chloral hydrate (400 mg.kg⁻¹ i.p.), were implanted with probes (CMA7 model, Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) located in the hippocampus (stereotaxic coordinates in mm from bregma (Hof *et al.*, 2000): A= +2.8, L= +3.0, V= -4.0; A, anterior; L, lateral; and V, ventral) (Richardson-jones *et al.*, 2010). Animals were allowed to recover from the surgery overnight. The next day, $\approx$ 20h after surgery, the probes were continuously perfused with aCSF (composition in mmol/L: NaCl 147, KCl 3.5, CaCl₂ 1.26, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.0, pH 7.4 $\pm$ 0.2) at a flow rate of 1.5 μ L/min in cortex using CMA/100 pump (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden), while animals were awake and freely moving in their cage. One hour after the start of aCSF perfusion stabilization period, four fractions were collected (one every 15 min) to measure the basal values (mean $\pm$ S.E.M. corresponding to B₀ at t₀) calculated for each mouse before systemic administration or local perfusion of vehicle, escitalopram or desipramine. Subsequent dialysate samples were then collected for a 0–120 min post-treatment period and analyzed for 5-HT by a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (XL-ODS, 4.6 x 75 mm, particle size 3 μ m; Beckman) coupled to an amperometric detector (1049 A, Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The mobile phase for 5-HT contained 107 or 100 mM NaH₂PO₄, 140 or 151 μ M disodium EDTA; 0.77 or 3 mM I-octanesulphonic acid; respectively, and 20% (v/v) methanol (pH adjusted between 4.1 and 4.3 with phosphoric acid). Its flow rate through the HPLC column was set at 0.7 mL/min using a 118 pump (Beckman). The limit of sensitivity for 5-HT was $\approx$ 0.5 fmol/sample (signal-to-noise ratio=2). At the end of the experiments, localization of microdialysis probes was verified histologically (Bert *et al.*, 2004; Guilloux *et al.*, 2006).

ARN isolation and 5-HT_{1A} or 5-HT_{2A} expression

Coronal brain slices were performed using a Brain matrix, hippocampus and dorsal raphe nuclei were

separated under the microscope from the rest of the tissue and directly put in TRIzol (Invitrogen[®], USA). Total ARN from hippocampus or raphe nuclei was extracted from brain sections in TRIzol and assessed by chromatography (Agilent Bioanalyzer, Santa Clara, USA). Samples with an expert scoring number (RIN) above 7.2 were considered of good quality. 2 μ g of RNA were then reverse-transcribed with Anchored-Oligo(dT)₁₈ primers (Delteil *et al.*, 2008). Small PCR products (80–200 base-pairs) PCR products were amplified in triplicates using a LightCycler[®] Carousel-Based System (Roche, Mannheim, Germany) and SYBR Green PCR Master Mix Reagent (LightCycler[®] ARN Amplification Kit SYBR Green, Roche). Primer-dimers were assessed by amplifying primers without ADNC. Primers were retained if they produced no primer-dimers or non-specific signal after 35 cycles. Results were calculated as relative intensity compared to β -actin, and the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method with the tested primers was used to calculate the relative expression levels of the transcripts (Schmittgen and Livak, 2008).

Data statistical analysis

Results from hypothermia analyses were expressed as mean $\pm$ SEM of decrease in body temperature (behavior). Electrophysiological data obtained from recordings in the DR were expressed as means $\pm$ S.E.M. of the firing rate of 5-HT neurons. Neurochemical data obtained from dialysate 5-HT in the hippocampus were expressed as means $\pm$ S.E.M. of AUC for the extracellular levels of 5-HT. A one- or two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures (when appropriate) on pre-treatment, treatment and/or genotype (5-HT_{2A}^{+/+} vs. 5-HT_{2A}^{-/-}) factors was performed to compare the experimental groups. When ANOVA were statistically significant, pairwise comparisons were performed using Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test with the computer software StatView 4.02 when appropriate. The level of statistical significance was set at P<0.05.

RESULTS

Effects of the genetic inactivation of the 5-HT_{2A} receptor on the spontaneous firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe.

One-way ANOVA on the basal firing rate of DR 5-HT neurons revealed a significant effect of genotype factor

[F(1,92)=5.6, $p<0.05$]. Figure 1 shows that 5-HT_{2A}^{-/-} displayed a higher spontaneous firing rate of DR 5-HT neurons than their wild-type littermates, raising the possibility that 5-HT_{2A} receptor exerts a tonic receptor inhibitory influence on serotonergic neuronal activity.

Effects of DOI on the firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe of 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice

5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice were then administered with increasing doses of DOI (1-10 mg/kg s.c.). A two-way ANOVA with repeated measures on the firing rate of DR 5-HT neurons indicated a significant effect of treatment [F(1,36)=11.6, $p<0.01$] and genotype factors [F(1,36)=25.3, $p<0.001$]. DOI induced a dose-dependent inhibition of DR 5-HT neuronal activity in 5-HT_{2A}^{+/+} with a maximal decreased observed at the highest dose tested (10 mg/kg; s.c.). In a marked contrast, this inhibitory effect was completely blunted in 5-HT_{2A}^{-/-} mice thus confirming the inhibitory role of 5-HT_{2A} receptor on the serotonergic system and demonstrating the selectivity of DOI towards 5-HT_{2A} receptor in this response (Figure 2A).

In order to identify the brain region involved in the inhibitory effect of DOI, we then examined the effect of this selective 5-HT_{2A} receptor agonist in 5-HT_{2A}^{+/+} mice pre-treated with the neurotoxin DSP-4 at the doses of 25 and 50 mg/kg i.p. One-way ANOVA with repeated measures on the firing rate of DR 5-HT neurons indicated a significant effect of pre-treatment factor [F(2, 48)=7.06, $p<0.05$]. The inhibitory effect of DOI on DR 5-HT neuronal activity was significantly attenuated in DSP-4 (25 mg/kg; i.p.) pre-treated mice whereas no greater electrophysiological effects were observed by increasing the dose of DSP-4 at 50 mg/kg; i.p (Figure 2B). Since, it was previously reported that DSP-4 (25 mg/kg; i.p.) results in a selective lesion of the noradrenergic system whereas DSP-4 (50 mg/kg; i.p.) produced the ablation of both the noradrenergic and dopaminergic systems (Cassano *et al.*, 2009), the present data strongly suggest that the inhibitory effect of DOI on DR 5-HT neuronal activity involved, at least in part, NE neurons.

Effects of the SSRI escitalopram on the firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe of 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice

Having established that 5-HT_{2A} receptor exerts an inhibitory effect on DR 5-HT neuronal activity, we

hypothesized that the inhibitory action of SSRIs might persist in mice lacking the 5-HT_{1A} autoreceptor. In 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice, separate one-way ANOVA on the firing rate of DR 5-HT neurons indicated a significant effect of treatment factor [F(2,15)=9.1, $p<0.01$], [F(2,17)=14.6, $p<0.01$] and [F(3,21)=6.2, $p<0.05$]. All dorsal raphe 5-HT neurons tested in 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice were inhibited by escitalopram (4 mg/kg s.c.). In 5-HT_{1A}^{+/+} mice, the inhibitory effect of escitalopram was reversed by the subcutaneous administration of WAY 100635 (Figure 3A). In 5-HT_{1A}^{-/-} mice, the inhibitory effect of escitalopram was reversed by MDL100907 but not by WAY100635 (Figures 3B-D).

Functional status of 5-HT_{2A} receptors in 5-HT_{1A}^{-/-} mice

As illustrated in figure 4A, 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice were treated with DOI (0.5-2 mg/kg s.c.) to assess the functional status of 5-HT_{2A} receptor. Two-way ANOVA with repeated measures on the firing rate of DR 5-HT neurons indicated a significant effect of treatment [F(2,15)=14.3, $p<0.01$] and genotype [F(1,15)=5.3, $p<0.01$] factors. DOI induced a decrease in DR 5-HT neuronal firing in both 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice. However, the electrophysiological effects of DOI were more pronounced in the latter group of mutants. Thus, hypersensitization of 5-HT_{2A} receptor may represent an adaptive response aimed at counter-balancing the loss of 5-HT_{1A} autoreceptors. To explore the possibility that this hypersensitization in 5-HT_{1A}^{-/-} resulted from an increase in the density of 5-HT_{2A} receptor, qPCR analysis was performed to determine the expression of this receptor in the hippocampus. Our results showed an increase in 5-HT_{2A} mRNA levels in 5-HT_{1A}^{-/-} mice when compared to 5-HT_{1A}^{+/+} mice [F(1,14)=22.3, $p<0.001$, Figure 4B].

Functional status of 5-HT_{1A} receptor in 5-HT_{2A}^{-/-} mice

In a last series of experiments, we determined the functional status of 5-HT_{1A} in 5-HT_{2A}^{-/-} KO mice by using three complementary approaches.

8-OHDPAT-induced hypothermia.

In mice, 8-OHDPAT-induced hypothermia is mediated by 5-HT_{1A} autoreceptor (Richardson-Jones *et al.*, 2010). We used this response to assess the functional status of this receptor in 5-HT_{2A}^{-/-} mice. One-way ANOVA with repeated measure on body temperature revealed a

significant effect of genotype factors [$F(1,118)=34.5$, $p<0.01$]. 8-OHDPAT (50-300 $\mu\text{g/kg}$ s.c.) significantly decreased body temperature in both 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice but this decrease was greater in 5-HT_{2A}^{-/-} mice (Figure 5A).

8-OHDPAT-induced inhibition of DR 5-HT neuronal activity.

In mice, 8-OHDPAT-induced inhibition of DR 5-HT neuronal activity is mediated by 5-HT_{1A} autoreceptor (Gobbi *et al.*, 2001). A one-way ANOVA on the firing rate of DR 5-HT neurons revealed a significant effect of genotype factors [$F(1,45)=11.6$, $p<0.05$]. 8-OHDPAT (50-300 $\mu\text{g/kg}$ s.c.) significantly decreased the firing rate of DR 5-HT neurons in both 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice but this response was enhanced in 5-HT_{2A}^{-/-} mice (Figure 5B).

Potentiation of SSRI-induced increased in extracellular levels of 5-HT by WAY100635

In mice, WAY100635-induced potentiation of the effects of SSRI on extracellular levels of 5-HT at nerve terminal is mediated by 5-HT_{1A} autoreceptor (Froger *et al.*, 2001). Two-way ANOVA on the extracellular levels of 5-HT in the hippocampus indicated a significant effect of treatment [$F(2,13)=3.1$, $p<0.05$] and genotype [$F(1,13)=5.2$, $p<0.05$] factors. Figure 5C shows that escitalopram similarly increase the hippocampal extracellular concentrations of 5-HT in 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice. However, although WAY100635 (0.1 mg/kg s.c.) failed to enhance the effect of escitalopram in 5-HT_{2A}^{+/+} (sub-active dose), it potentiated the effect of the SSRI in 5-HT_{2A}^{-/-} mice thus confirming the hypersensitivity of 5-HT_{1A}autoreceptor in these mutants (Figure 5C).

DISCUSSION

5-HT_{1A} autoreceptor is known to play a role in mood disorders and their treatments. Indeed, an increase in somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor density in the dorsal raphe (DR) attenuates the therapeutic activity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), whereas their functional desensitization promotes activation of brain serotonergic transmission, thereby representing an adaptive change relevant to their therapeutic effect (Gardier *et al.*, 1996; Blier and Ward, 2003; Richardson-jones *et al.*, 2010). Nevertheless, multiple source of evidence suggest

that other serotonergic receptors including 5-HT_{2A} type may also exert inhibitory effects on the DR 5-HT neurons raising the possibility that the functional inactivation of 5-HT_{1A} autoreceptor would be necessary, but not sufficient for SSRIs to exert their optimal antidepressant activity. The present study examined the role of 5-HT_{2A} receptor in the regulation of the serotonergic system and more particularly its functional interaction with 5-HT_{1A} autoreceptor.

Our electrophysiological data demonstrate that the inactivation or the stimulation of 5-HT_{2A} receptor, increased or reduced respectively the firing activity of DR 5-HT neurons. This findings concur with previous studies in rats showing that the administration of the 5-HT_{2A} receptor agonist DOI, produced an inhibitory impact upon the serotonergic system (Marek and Aghajanian, 1996; Stark *et al.*, 2007; Ghanbari *et al.*, 2009; Rhaman *et al.*, 2011). Nevertheless, since the selectivity of DOI for 5-HT_{2A} receptor remains somewhat equivocal (Banas *et al.*, 2010), the present study examined whether or not its electrophysiological effects were altered in 5-HT_{2A}^{-/-} mice. The observation that DOI-induced decrease in DR 5-HT neuronal activity was completely blunted in 5-HT_{2A}^{-/-} mice confirmed the involvement of 5-HT_{2A} in this response. The possibility that DOI might have, however, acted through another receptor such as 5-HT_{2C} could not be ruled out. However, we verified that the electrophysiological effects of DOI were not altered in 5-HT_{2C}^{-/-} mice (data not shown). Immuno-histochemical data indicated that the frontal cortex, but also the catecholaminergic nuclei including the locus coeruleus (LC) and the ventral tegmental area (VTA) are endowed with a high density of 5-HT_{2A} receptor (Cornea-Hebert *et al.*, 2002). In order to identify the brain region involved in the inhibitory effect of DOI, we tested the effect of this selective 5-HT_{2A} receptor agonist in mice displaying a lesion of the noradrenergic or the noradrenergic/dopaminergic systems. Indeed, it was reported that, depending on the dose, the neurotoxin DSP-4 could trigger one or both systems (Cassano *et al.*, 2009). Interestingly, we showed that the loss of noradrenergic neurons attenuated the inhibitory effects of DOI on the activity of DR 5-HT neurons while the combined lesion of the noradrenergic and the dopaminergic systems failed to produce additional attenuation. These results strongly suggested that the control of serotonergic neurons by 5-HT_{2A} receptor specifically involved noradrenergic neurons, which are anatomically and functionally connected to 5-HT

neurons in the DR (Guiard *et al.*, 2009). This conclusion is consistent with previous data from Dr Blier's group reporting that SSRI treatment enhances a tonic inhibitory influence by 5-HT on LC neurons through postsynaptic 5-HT_{2A} receptors that are located on local GABAergic interneurons (Blier and Szabo, 2005). Despite these findings, we cannot exclude the possibility that the electrophysiological effects of DOI involved others pathways. The frontal cortex, whose pyramidal neurons project within the rats and mice DR (Martin-Ruiz *et al.*, 2001; Bortolozzi *et al.*, 2003; Amargos-Bosh *et al.*, 2004), represents a putative target for the action of DOI. However, it has been previously reported that the local infusion of DOI in the frontal cortex increases the firing rate of DR 5-HT neurons (Martin-Ruiz *et al.*, 2001). Having shown that 5-HT_{2A} receptor exerts a tonic inhibitory effect in the DR of wild-type mice, we next asked whether this receptor could maintain or enhance his negative influence in mice lacking the 5-HT_{1A} receptor. Interestingly, we found that the ability of DOI to decrease DR 5-HT neuronal activity was potentiated in 5-HT_{1A} *-/-* mice indicating 5-HT_{2A} receptor hypersensitivity in these mutants. This observation was corroborated by data showing an increased expression of 5-HT_{2A} receptor in 5-HT_{1A} *-/-* mice. In this context, we tested the effect of the SSRI escitalopram on the firing rate of DR 5-HT neurons in 5-HT_{1A} *+/+* and 5-HT_{1A} *-/-* mice. As expected and previously shown, escitalopram decrease the firing rate of serotonergic neurons in wild-type mice (Guiard *et al.*, 2011). More surprisingly, this response persisted in 5-HT_{1A} *-/-* and was reversed by the 5-HT_{2A} receptor antagonist MDL100907. This stands in contrast with a previous electrophysiological study showing that fluoxetine failed to decrease to neuronal activity of 5-HT neurons in 5-HT_{1A} *-/-* mice (Amargos-Bosh *et al.*, 2004) but this lack of response can result from the 5-HT_{2A/2C} antagonistic activity of the SSRI. Thus, one of the most remarkable result obtained in this study is the observation that 5-HT_{2A} hetero-receptors maintain an inhibitory influence on the serotonergic system, particularly in response to increased levels of endogenous 5-HT induced by SSRI. The genetic inactivation of 5-HT_{1A} was compensated by an over-expression of 5-HT_{2A} receptor thereby maintaining an inhibitory effect on the serotonergic system. Such functional interaction between both receptors has been reported previously. In particular it has been shown that sustained administration of SSRI produced a

functional desensitization of 5-HT_{1A} receptor while increasing that of 5-HT_{2A} receptor (Cadogan *et al.*, 1993). Finally, to address the possibility that the reciprocal interaction was also true, we tested the sensitivity of 5-HT_{1A} receptor in mice lacking 5-HT_{2A} receptor. Several lines of evidence, including behavioral, electrophysiological and neurochemical data support the fact that 5-HT_{1A} autoreceptor is up-regulated in 5-HT_{2A} *-/-* mice. In conclusion the present study unveiled a functional reciprocal interaction between inhibitory 5-HT_{1A} auto- and 5-HT_{2A} hetero-receptors. The fact that both receptors exert a negative feedback on the serotonergic system underlies the importance to prevent their activation to improve the therapeutic activity of SSRI. Several augmentation strategies triggering on or the other of these receptors has been successfully applied with the blockade of 5-HT_{1A} receptor (pindolol: for review see Portella *et al.*, 2011) or of 5-HT_{2A} (antipsychotics: for review see Croxtall and Scott, 2010) represents an interesting alternative in the management of SSRI resistant patients.

REFERENCES

- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, Adell A, Celada P, Toth M, Mengod G, Artigas F (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin1A and serotonin2A receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex*. **14**(3):281-99
- Ashby CR Jr, Edwards E, Wang RY (1994). Electrophysiological evidence for a functional interaction between 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the rat medial prefrontal cortex: an iontophoretic study. *Synapse* **17**(3):173-81.
- Banas SM, Doly S, Boutourlinsky K, Diaz SL, Belmer A, Callebert J, Collet C, Launay JM, Maroteaux L (2010). Deconstructing antiobesity compound action: requirement of serotonin 5-HT2B receptors for dexfenfluramine anorectic effects. *Neuropsychopharmacology*. **36**(2):423-33.
- Bert L, Favale D, Jégo G, Greve P, Guilloux JP, Guiard BP, *et al.* (2004). Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. *J Neurosci Methods* **140**(1-2): 53-57.
- Blier P, Szabo ST (2005). Potential mechanisms of action of atypical antipsychotic medications in treatment-

- resistant depression and anxiety. *J Clin Psychiatry*. **66** Suppl 8:30-40.
- Blier P, Ward NM (2003). Is there a role for 5-HT_{1A} agonists in the treatment of depression? *Biol Psychiatry*. **53**(3):193-203.
- Boothman LJ, Allers KA, Rasmussen K, Sharp T (2003). Evidence that central 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B/C} receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat. *Br J Pharmacol*. **140**(1):227-8.
- Borsini F (1994). Balance between cortical 5-HT_{1A} and 5-HT₂ receptor function: hypothesis for a faster antidepressant action. *Pharmacol Res*. **30**(1):1-11.
- Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Adell A, Díaz-Mataix L, Serrats J, Pons S, Artigas F (2003). In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT(2A) receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci*. **18**(5):1235-46.
- Cadogan AK, Marsden CA, Tulloch I, Kendall DA (1993). Evidence that chronic administration of paroxetine or fluoxetine enhances 5-HT₂ receptor function in the brain of the guinea pig. *Neuropharmacology*. **3**:249-56.
- Cassano T, Gaetani S, Morgese MG, Macheda T, Laconca L, Dipasquale P, Taltavull J, Shippenberg TS, Cuomo V, Gobbi G (2009). Monoaminergic changes in locus coeruleus and dorsal raphe nucleus following noradrenaline depletion. *Neurochem Res*. **34**(8):1417-26.
- Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F (2004). The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci*. **29**(4):252-65.
- Cornea-Hébert V, Watkins KC, Roth BL, Kroeze WK, Gaudreau P, Leclerc N, Descarries L (2002). Similar ultrastructural distribution of the 5-HT(2A) serotonin receptor and microtubule-associated protein MAP1A in cortical dendrites of adult rat. *Neuroscience*. **113**(1):23-35.
- Croxtall JD, Scott LJ (2010). Olanzapine/fluoxetine: a review of its use in patients with treatment-resistant major depressive disorder. *CNS Drugs*. **24**(3):245-62.
- Darmani NA, Martin BR, Glennon RA (1990). Withdrawal from chronic treatment with (+/-)-DOI causes supersensitivity to 5-HT₂ receptor-induced head-twitch behaviour in mice. *Eur J Pharmacol*. **186**(1):115-8.
- Dawson LA, Nguyen HQ, Smith DL, Schechter LE (2002). Effect of chronic fluoxetine and WAY-100635 treatment on serotonergic neurotransmission in the frontal cortex. *J Psychopharmacol*. **16**(2):145-52.
- Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, Repérant C, Guilloux JP, Coudoré F, Hen R, Gardier AM (2008). Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology*. **55**(6):1006-14.
- Dougherty JP, Aloyo VJ (2011). Pharmacological and behavioral characterization of the 5-HT_{2A} receptor in C57BL/6N mice. *Psychopharmacology (Berl)*. **215**(3):581-93.
- Egashira N, Iwasaki K, Ishibashi A, Hayakawa K, Okuno R, Abe M, Uchida N, Mishima K, Takasaki K, Nishimura R, Oishi R, Fujiwara M (2008). Repeated administration of Yokukansan inhibits DOI-induced head-twitch response and decreases expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptors in the prefrontal cortex. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **32**(6):1516-20.
- El Mansari M, Blier P (2005). Responsiveness of 5-HT(1A) and 5-HT₂ receptors in the rat orbitofrontal cortex after long-term serotonin reuptake inhibition. *J Psychiatry Neurosci*. **30**(4):268-74.
- El Mansari M, Sánchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. **30**(7):1269-77.
- Fantegrossi WE, Simoneau J, Cohen MS, Zimmerman SM, Henson CM, Rice KC, Woods JH (2010). Interaction of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in R(-)-2,5-dimethoxy-4-iodoamphetamine-elicited head twitch behavior in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. **335**(3):728-34.
- Froger N, Gardier AM, Moratalla R, Alberti I, Lena I, Boni C, De Felipe C, Rupniak NM, Hunt SP, Jacquot C, Hamon M, Lanfumey L (2001). 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{1A} autoreceptor adaptive changes in substance P (neurokinin 1) receptor knock-out mice mimic antidepressant-induced desensitization. *J Neurosci*. **21**(20):8188-97.
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F (1996). Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol*. **10**(1):16-27.

- Ghanbari R, El Mansari M, Shahid M, Blier P (2009). Electrophysiological characterization of the effects of asenapine at 5-HT(1A), 5-HT(2A), alpha(2)-adrenergic and D(2) receptors in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol.* **19**(3):177-87.
- Gobbi G, Murphy DL, Lesch K, Blier P (2001). Modifications of the serotonergic system in mice lacking serotonin transporters: an in vivo electrophysiological study. *J Pharmacol Exp Ther.* **296**(3):987-95.
- Gobert A, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ (1997). Potentiation of the fluoxetine-induced increase in dialysate levels of serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely moving rats by combined blockade of 5-HT1A and 5-HT1B receptors with WAY 100,635 and GR 127,935. *J Neurochem.* **68**(3):1159-63.
- Guiard BP, El Mansari M, Blier P (2009). Prospect of a dopamine contribution in the next generation of antidepressant drugs: the triple reuptake inhibitors. *Curr Drug Targets.* **10**(11):1069-84.
- Guiard BP, Mansari ME, Murphy DL, Blier P (2011). Altered response to the selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram in mice heterozygous for the serotonin transporter: an electrophysiological and neurochemical study. *Int J Neuropsychopharmacol.* **25**:1-13. [Epub ahead of print]
- Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Reperant C, Toth M, et al. (2006). Blockade of 5-HT1A receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT1A receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **31**(10): 2162-2172.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000). *Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains with CD ROM.* Elsevier:
- Huang M, Ichiwaka J, Li Z, Dai J, Meltzer HY (2006). Augmentation by citalopram of risperidone-induced monoamine release in rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl).* **185**(3):274-81.
- Li JX, Crocker C, Koek W, Rice KC, France CP (2011). Effects of serotonin (5-HT)1A and 5-HT2A receptor agonists on schedule-controlled responding in rats: drug combination studies. *Psychopharmacology (Berl).* **213**(2-3):489-97.
- Li Q, Rittenhouse PA, Levy AD, Alvarez Sanz MC, Van de Kar LD (1992). Neuroendocrine responses to the serotonin2 agonist DOI are differentially modified by three 5-HT1A agonists. *Neuropharmacology.* **31**(10):983-9.
- Marek GJ, Aghajanian GK (1996). LSD and the phenethylamine hallucinogen DOI are potent partial agonists at 5-HT2A receptors on interneurons in rat piriform cortex. *J Pharmacol Exp Ther.* **278**(3):1373-82.
- Marek GJ, Martin-Ruiz R, Abo A, Artigas F (2005). The selective 5-HT2A receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine. *Neuropsychopharmacology.* **30**(12):2205-15.
- Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, Mengod G, Artigas F (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci.* **21**(24):9856-66.
- Muraki I, Inoue T, Koyama T (2008). Effect of co-administration of the selective 5-HT1A receptor antagonist WAY 100,635 and selective 5-HT1B/1D receptor antagonist GR 127,935 on anxiolytic effect of citalopram in conditioned fear stress in the rat. *Eur J Pharmacol.* **586**(1-3):171-8.
- Naumenko VS, Bazovkina DV, Kondaurova EM, Zubkov EA, Kulikov AV (2010). The role of 5-HT2A receptor and 5-HT2A/5-HT1A receptor interaction in the suppression of catalepsy. *Genes Brain Behav.* **9**(5):519-24.
- Popova NK, Kulikov AV (1995). On the role of brain serotonin in expression of genetic predisposition to catalepsy in animal models. *Am J Med Genet.* **60**(3):214-20.
- Portella MJ, de Diego-Adeliño J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, Santos B, Álvarez E, Artigas F, Pérez V (2011). Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. *J Clin Psychiatry.* **72**(7):962-9.
- Rahman W, Bannister K, Bee LA, Dickenson AH (2011). A pronociceptive role for the 5-HT2 receptor on spinal nociceptive transmission: an in vivo electrophysiological study in the rat. *Brain Res.* **1382**:29-36.
- Reissig CJ, Eckler JR, Rabin RA, Rice KC, Winter JC (2008). The stimulus effects of 8-OH-DPAT: evidence for a 5-HT2A receptor-mediated component. *Pharmacol Biochem Behav.* **88**(3):312-7.

- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R, Leonardo ED (2010). 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*. **65**(1):40-52.
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. **3**(6):1101-8.
- Silver H, Susser E, Danovich L, Bilker W, Youdim M, Goldin V, Weinreb O (2011). SSRI augmentation of antipsychotic alters expression of GABA(A) receptor and related genes in PMC of schizophrenia patients. *Int J Neuropsychopharmacol*. **14**(5):573-84.
- Stark AD, Jordan S, Allers KA, Bertekap RL, Chen R, Mistry Kannan T, Molski TF, Yocca FD, Sharp T, Kikuchi T, Burris KD (2007). Interaction of the novel antipsychotic aripiprazole with 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors: functional receptor-binding and in vivo electrophysiological studies. *Psychopharmacology (Berl)*. **190**(3):373-82.
- Van der Heyden JA, Zethof TJ, Olivier B (1997). Stress-induced hyperthermia in singly housed mice. *Physiol Behav*. **62**(3):463-70.

FIGURES

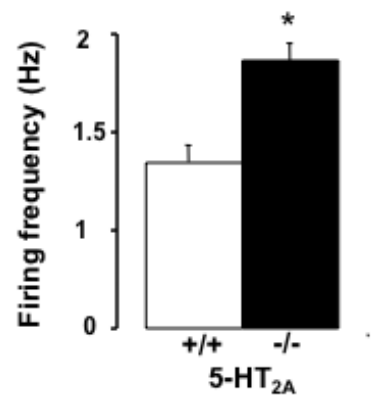


Figure 1: Effects of the genetic inactivation of the 5-HT_{2A} receptor on the spontaneous firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe. * $p < 0.05$: significantly different from 5-HT_{2A} +/+ wild-types (WT, $n = 5$ mice per group).

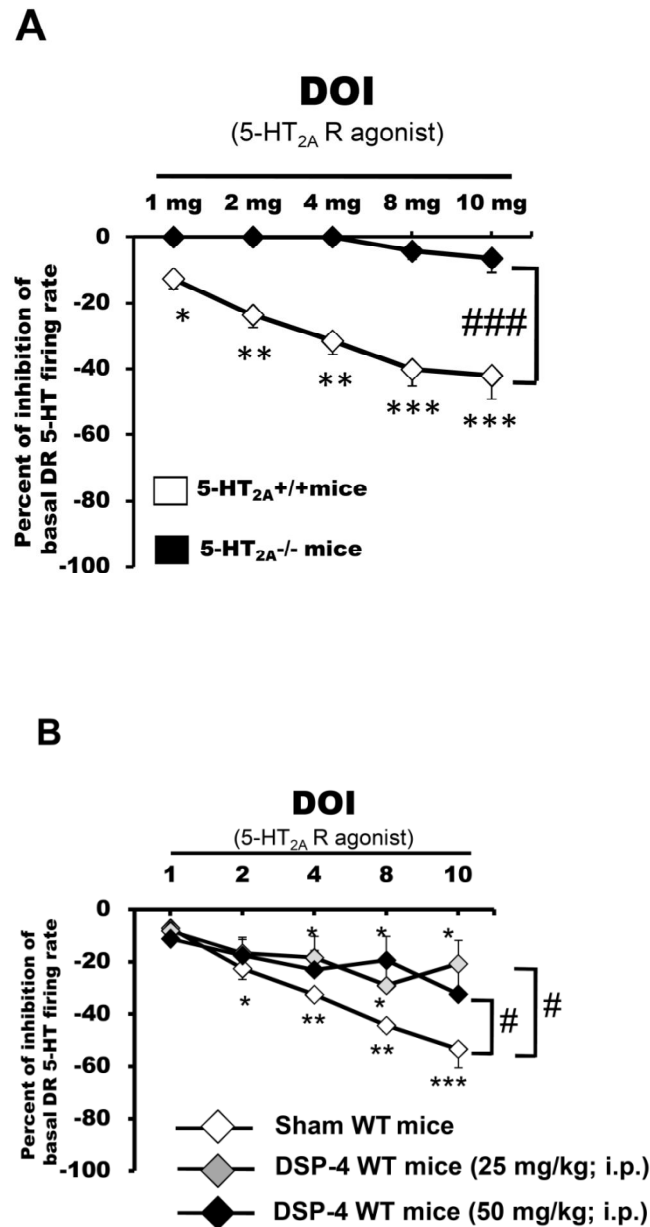


Figure 2: Effects of DOI on the firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe of 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice. A. Percent of inhibition of basal DR 5-HT firing rate in 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice administrated with DOI (1-10 mg/kg s.c.). **B.** Percent of inhibition of basal DR 5-HT firing rate in WT induced by DOI in DSP-4 (25; 50 mg/kg i.p.) pre-treated mice. In these experiments, DSP-4 was injected 7 days before the electrophysiological recordings. *p<0.05; **p<0.01 and ***p<0.001: significantly different from baseline of the corresponding group. #p<0.05: significantly different from and DSP-4 pre-treated mice. (n= 5 mice per group).

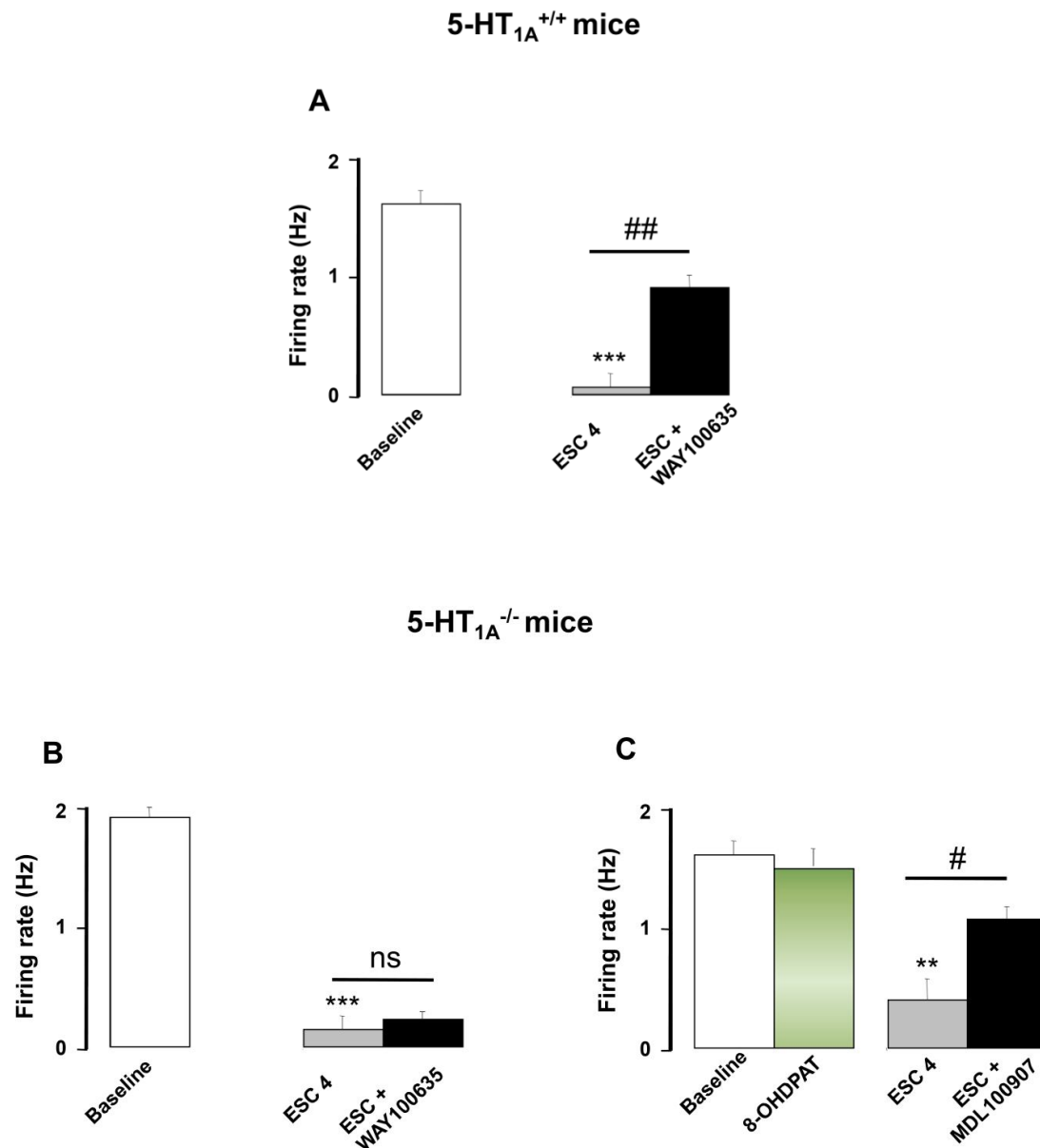
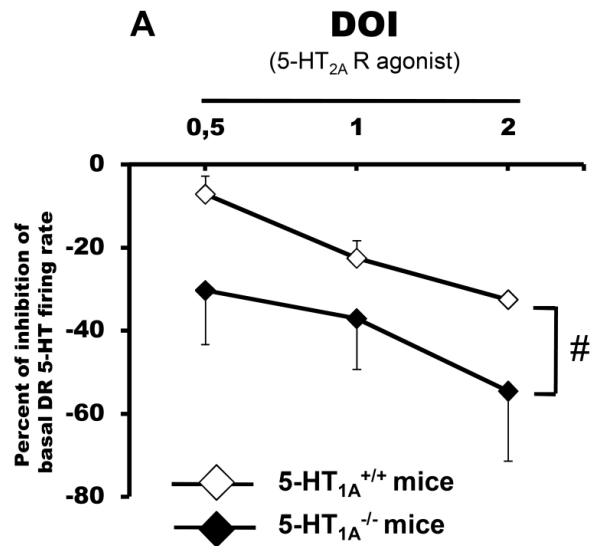


Figure 3: Effects of the SSRI escitalopram on the firing rate of 5-HT neurons in the dorsal raphe of 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice. **A.** Firing rate of DR 5-HT neurons in 5-HT_{1A}^{+/+} mice injected with vehicle (baseline), escitalopram (ESC 4 mg/kg s.c) or escitalopram + WAY100635 (0.5 mg/kg; s.c.). **B, C.** Firing rate of DR 5-HT neurons in the DR 5-HT_{1A}^{-/-} mice injected with vehicle (baseline), 8-OHDPAT (0.2 mg/kg; s.c.), escitalopram (ESC 4 mg/kg s.c), escitalopram + MDL100907 (2 mg/kg; s.c.) or escitalopram + WAY100635 (0.5 mg/kg; s.c.), when administrated esc 4 mg/kg s.c. or esc + WAY 100635 or esc + MDL 100907. **p<0.01 and ***p<0.001: significantly different from baseline. #p<0.05 and ##p<0.01: significantly different escitalopram injected mice. ns: not significant. (n= 5 mice per group).



B HIPPOCAMPUS

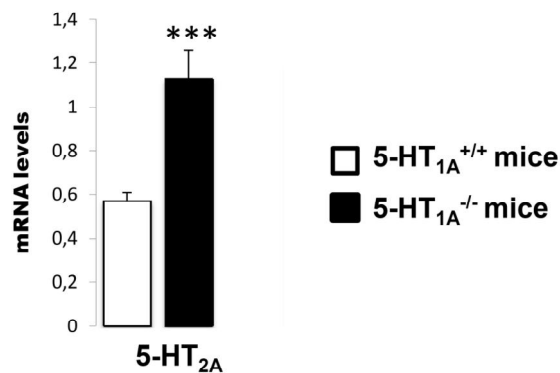
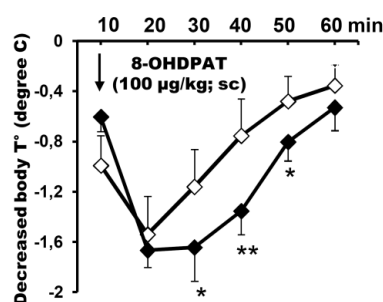
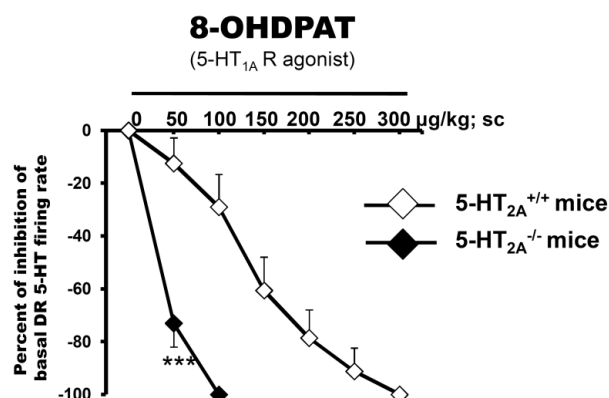


Figure 4: Functional status of 5-HT_{2A} receptors in 5-HT_{1A}^{-/-} mice. **A.** Percent of inhibition of basal DR 5-HT firing rate in 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice administrated with DOI (0.5-2 mg/kg s.c.). [#]p<0.05: significantly from 5-HT_{1A}^{+/+} mice. (n= 5 mice per group). **B.** Expression of 5-HT_{2A} receptor in the hippocampus in 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice. Data are expressed as percentage of relative expression in 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice. ***p<0.001: significantly from 5-HT_{1A}^{+/+} mice. (n= 8 mice per group).

A HYPOTHERMIA



B ELECTROPHYSIOLOGY



C INTRACEREBRAL MICRODIALYSIS

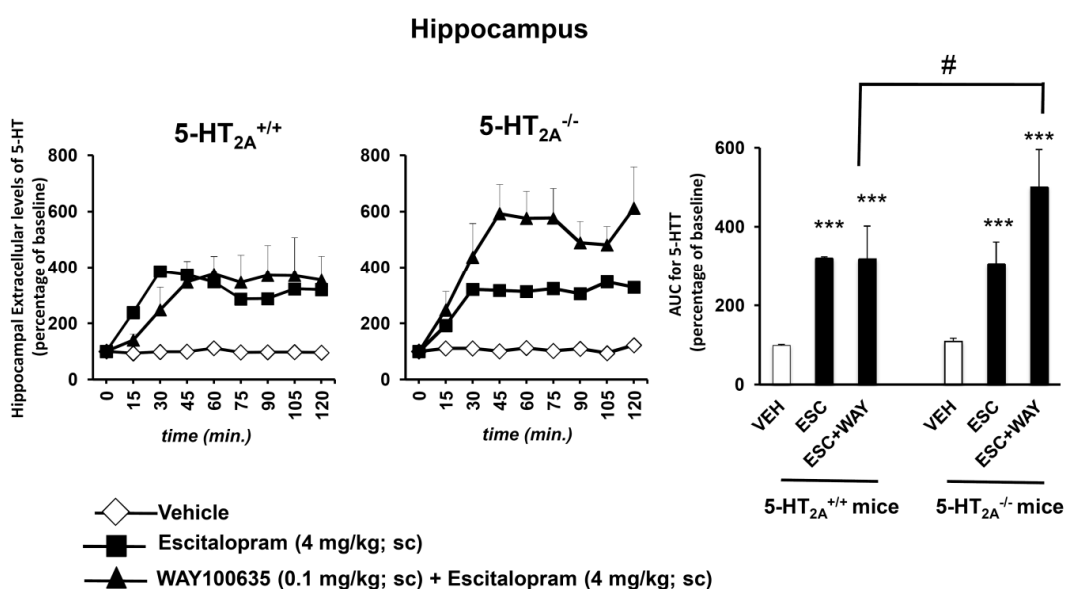


Figure 5: Functional status of 5-HT_{1A} receptor in 5-HT_{2A}^{-/-} mice. **A.** Behavioral consequences of 8-OHDPAT induced hypothermia in 5-HT_{1A}^{+/+} and 5-HT_{1A}^{-/-} mice. Results are expressed as means $\pm$ SEM of rectal temperature in 5-HT_{1A}^{+/+} ($\diamond$) and 5-HT_{1A}^{-/-} mice ($\blacklozenge$) measured at different times. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ significantly different from 5-HT_{1A}^{+/+} mice. (n= 10 mice per group). **B.** Percent of inhibition of basal DR 5-HT firing rate in 5-HT_{2A}^{+/+} and 5-HT_{2A}^{-/-} mice administrated with 8-OH-DPAT (50-300 µg/kg s.c.). *** $p < 0.01$ significantly different from 5-HT_{1A}^{+/+} mice. (n= 5 mice per group). **C.** Time course and AUC values. Data are means $\pm$ S.E.M. values of [5-HT]_{ext} expressed as percentages of baseline (B₀) following exposure to vehicle or escitalopram or escitalopram + WAY100635. Arrow indicates the time at which the injection of either vehicle in WT ($\diamond$) or escitalopram 4 mg·kg⁻¹, s.c. ($\blacksquare$) or escitalopram + WAY 100635 ($\blacktriangle$) was performed. *** $p < 0.001$: significantly different from vehicle. # $p < 0.05$: significantly different from 5-HT_{1A}^{+/+} mice. (n=5-7 mice per group).

ARTICLE 4: Etude du statut fonctionnel de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans un modèle de souris anxio/dépressive

Quentin Rainer*, **Hai Thanh Nguyen***, Gaël Quesseveur, Alain M. Gardier, Denis J. David, Bruno P. Guiard

Soumis

Résumé : Notre recherche consiste à évaluer le degré de désensibilisation des autorécepteurs 5-HT_{1A} du noyau du raphé dorsal (NRD) dans un modèle de souris anxio-dépressives (basé sur l'administration chronique de corticostérone dans l'eau de boisson) en réponse à un traitement antidépresseur, la fluoxétine.

Principaux résultats

● A l'aide du test d'hypothermie induite par le 8-OHDPAT, nos résultats ont montré que la sensibilité de l'autorécepteur 5-HT_{1A} était réduite chez les animaux traités à la corticostérone comparé au groupe contrôle. L'administration chronique de fluoxétine a également entraîné une désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans les deux groupes d'animaux mais qui s'est avérée plus prononcée dans le groupe prétraité à la corticostérone.

● A l'aide des techniques d'électrophysiologie et de microdialyse *in vivo*, nous avons reproduit ces résultats à savoir que la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} a été observée dans le groupe prétraité à la corticostérone mais qu'elle a été renforcée dans le groupe de souris ayant reçu la combinaison corticostérone plus fluoxétine. En particulier, ces résultats se sont traduits par une plus faible capacité du 8-OHDPAT à diminuer l'activité électrique des neurones sérotoninergiques et la libération de 5-HT dans le NDR.

● En dépit de la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans le groupe ayant reçu uniquement la corticostérone, l'activité électrique et les concentrations extracellulaires basales de 5-HT dans le NRD n'ont pas été modifiées comparées aux animaux contrôles (1.8 ± 0.4 vs 2.1 ± 0.3 Hz ; 13.4 ± 4.1 vs 14.8 ± 3.6 fmol). En revanche, ces paramètres électrophysiologiques et neurochimiques ont été significativement augmentés dans le groupe ayant reçu la combinaison corticostérone plus fluoxétine comparés au groupe véhicule plus fluoxétine (2.3 ± 0.2 vs 1.1 ± 0.1 Hz ; 114.9 ± 24.1 vs 75.9 ± 3.1 fmol).

Conclusion

L'ensemble de ces résultats démontre une synergie d'effet entre la corticostérone et la fluoxétine sur la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans le NRD et pourrait expliquer le fait que les ISRS exercent leurs effets spécifiquement en conditions pathologiques.

ABSTRACT

Most of preclinical studies investigating the effects and the mechanism of action of antidepressants have been performed in naive rodents. This is inappropriate since antidepressants act on the core symptoms of the pathology. Recently, we have developed and characterized a mouse model of anxiety/depression based on corticosterone addition in the drinking water. This model is highly reproducible and easy to set up compared to other animal models such as the unpredictable chronic mild stress. 5-HT_{1A} autoreceptor is known to play a role in mood disorders and their treatments. Indeed, an increase in somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor density in the dorsal raphe (DR) attenuates the therapeutic activity of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), whereas their functional desensitization promotes activation of brain serotonergic transmission, thereby representing an adaptive change relevant to their therapeutic effect. Here we assessed the effects of sustained administration of the SSRI fluoxetine on 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity in mice administered with corticosterone. Fluoxetine attenuated the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino) tetralin (8-OHDPAT)-induced hypothermia in both vehicle- and corticosterone-pre-treated mice. However, such desensitization was more pronounced in corticosterone pre-treated mice. This change had an overall effect on serotonergic tone since we found a greater firing rate of 5-HT neurons associated with an enhancement of 5-HT outflow in the DR of corticosterone-pre-treated mice in response to fluoxetine compared to the corresponding group of vehicle-pre-treated mice. These results emphasize the contribution of an animal model of anxiety/depression in describing the cellular and molecular consequences of chronic SSRI treatment.

Keywords: Serotonin, agonist, autoreceptor, depression, anxiolytic, corticosterone.

INTRODUCTION

Alterations in multiple biological markers are implicated in the neurobiology of depression, based primarily on the characterization of antidepressant efficacy in naive rodents (Gourley and Taylor, 2009). However it appears more appropriate to perform pharmacological studies in animal models that exhibit hallmark characteristics of anxiety/depression. Several animal models have been developed, mainly based on stressful situations such as chronic unpredictable chronic mild stress (UCMS). Although UCMS has been efficiently used to assess antidepressant activity (Surget et al., 2009; Farley et al., 2010), it is notoriously difficult to reproduce consistently in rodents. An intriguing alternative may be to supply mice with exogenous corticosterone (David et al., 2009; Gourley and Taylor, 2009), a hormone produced in the adrenal glands in response to stress, and found to be elevated in several animal models of depression and in depressed humans (Sterner and Kalynchuk, 2010). We have recently reported some behavioral abnormalities in mice administered with corticosterone indicative of anhedonia and hopelessness (Gourley et al., 2008; David et al., 2009) that mimic depressive symptoms observed in humans (Holsboer, 2000; Nemeroff and Valle, 2005). Therefore corticosterone-treated mice provide a good preclinical model to investigate the interaction between hypothalamic-pituitary-adrenocortical (HPA) axis dysfunction, deficit in brain serotonergic system and antidepressant response.

The activity of the serotonergic system is regulated by several extrinsic and intrinsic factors. In the dorsal raphe (DR), there is a negative feedback control driven by serotonin-1A (5-HT_{1A}) autoreceptor located in the soma and dendrites of 5-HT neurons. Activation of this presynaptic autoreceptor inhibits the firing rate of 5-HT neurons, the amount of 5-HT released per action potential, and 5-HT synthesis (Blier and de Montigny, 1987; Richardson-Jones et al., 2010). Clinical and preclinical studies have clearly established the role of this autoreceptor in mood disorders and their treatments. For example, enhanced radioligand binding of an agonist to the inhibitory 5-HT_{1A} autoreceptor in the human DR provided pharmacological evidence of diminished activity of serotonergic neurons in suicide victims afflicted with major depression (Stockmeier et al., 1998). In addition, a functional polymorphism in the promoter region of the human Htr1a gene was reported

(Lemondé et al., 2003) suggesting that an increase in the density of 5-HT_{1A} autoreceptor in the DR may predispose to depression (Lemondé et al., 2003; Le Francois et al., 2008). The role of 5-HT_{1A} autoreceptor in the mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors (SSRIs) has also been studied extensively. It is believed that an over-activation and/or -expression of 5-HT_{1A} autoreceptor would delay the onset of antidepressant effect, whereas the functional desensitization of this receptor after sustained administration of SSRIs is an adaptive change relevant to their therapeutic activity (Gardier et al., 1996). Using a new strategy to manipulate somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor in raphe nuclei without affecting 5-HT_{1A} heteroreceptor, it has been shown that mice with a low expression of autoreceptor display a greater behavioral response to fluoxetine, thus establishing a causal relationship between 5-HT_{1A} autoreceptor levels and the response to SSRIs (Richardson-Jones et al., 2010).

Surprisingly, despite the importance of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization in the appearance of the therapeutic effects of SSRIs, such functional inactivation was also reported in several animal models of stress including chronic sleep restriction (Evrard et al., 2006; Novati et al., 2008) and maternal separation (van Riel, 2004), but also in animal models of anxiety/depression i.e., the chronic mild stress (Lanfumeu et al., 1999; Froger et al., 2004; Grippo et al., 2005; Bambico et al., 2009). These results are consistent with findings showing an attenuation of 5-HT_{1A} receptor functions in a dysregulated HPA axis in both animals (Lanfumeu et al., 1999; Fairchild et al., 2003; Leitch et al., 2003; Hensler et al., 2007) and humans (Young et al., 1994b; McAllister-Williams et al., 2007). However, these results in animal models of stress have been challenged by recent findings showing, on the contrary, that the sensitivity and/or the density 5-HT_{1A} autoreceptor in the DR was increased in rats or mice models of depression (El Yacoubi et al., 2003; Greenwood, 2003; Pineda et al., 2011). Thus modeling stress or depression status in animals leads to distinct changes in 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity.

The present study was aimed at determining the nature and intensity of changes in 5-HT_{1A} autoreceptor function in a mice model of anxiety/depression exposed to chronic corticosterone given either alone or in combination with the SSRI fluoxetine. Ultimately, such data obtained in an animal model of anxiety/depression may help shed light on

the fact that SSRIs are specifically effective in depressed patients but not in healthy volunteers.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals.

Adult male C57BL/6J mice were purchased from Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, France). All corticosterone-administered mice were 7-8 weeks old and weighed 20-24 g at the beginning of the treatment. They were maintained on a 12L:12D schedule (lights on at 06:00 a.m.) and housed in groups of five. Food and water were provided *ad libitum*. Behavioral testing occurred during the light phase between 08:00 a.m. and 05:00 p.m. Separated groups were used to assess the behavioral, electrophysiological and neurochemical studies. All testing were conducted in compliance with protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (Council directive #87-848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions #92-256B to D.J. David).

Drugs.

In place of normal drinking water, grouped-housed mice were presented during 7 weeks with vehicle (0.45% hydroxypropyl- β -cyclodextrin) or corticosterone (35 μ g/ml) in the presence or absence of the SSRI fluoxetine (18 mg/kg/day) during the last three weeks of the corticosterone regimen. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-OHDPAT) hydrobromide and (N-{2-[4 (2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]ethyl}-N-(2-pyridinyl)cyclohexanecarboxamide tri-hydrochloride (WAY100635) were obtained from Sigma-Aldrich (L'Isle d'Abeau, France) and dissolved in saline solution (NaCl, 0.9%). Both pharmacological compounds were administered subcutaneously (s.c.) at the doses of 100-300 μ g/kg and 300 μ g/kg; respectively.

Body temperature.

Body temperature was assessed intrarectally, using a lubricated probe (BIO-BRET-3) inserted approximately 2 cm and monitored (BIO-TK9882, BIOSEB, Vitrolles, France). Three baseline body temperature measurements were taken to control that stress induces hyperthermia (Supplemental table) according to Van der Heyden et al.,

(1997). Ten minutes after the third baseline measurement, animals received 8-OHDPAT (100 µg/kg; s.c.) and body temperature was measured 10 min after the injection.

In vivo electrophysiology.

Mice were anesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg; i.p.) and placed in a stereotaxic frame with the skull positioned horizontally. To maintain a full anesthetic, chloral hydrate intraperitoneal supplements of 100 mg/kg were given as needed. The extracellular recordings were carried out using single glass micropipettes (Stoelting Europe, Dublin, Ireland) for recordings in the DR. Micropipettes were preloaded with fiberglass strands to promote capillary filling with a 2 M NaCl solution.

Recording of DR 5-HT neurons. Single glass micropipettes pulled on a pipette puller (Narishige, Tokyo, Japan) with impedances ranging from 2.5 to 5 mΩ, were positioned 0.2 to 0.5 mm posterior to the interaural line on the midline and lowered into the DR, usually attained at a depth between 2.5 and 3.5 mm from the brain surface (Franklin and Paxinos, 2007). The DR 5-HT neurons were identified using the following criteria: a slow (0.5–2.5 Hz) and regular firing rate and a long duration, positive action potential (Aghajanian and Vandermaelen, 1982). The total number of spontaneously active 5-HT neurons and their firing rates were determined by monitoring their average discharge frequency. In each mouse, several tracts were performed to measure the spontaneous firing rate of DR 5-HT neurons. At the end of the experiment, only one neuron was studied with 8-OHDPAT (100–300 µg/kg; s.c.) to assess the functional activity of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptor. WAY100635 was used to reverse the suppressant effect of 8-OHDPAT on the firing activity of DR 5-HT neurons. Changes in the firing activity were expressed as percentage of baseline firing rate.

In vivo microdialysis.

Concentric dialysis probes (active length of 1 mm) were made of cuprophane fibres and set up as described previously (Malagie et al., 1996). Animals were anaesthetized with chloral hydrate (400 mg/kg, i.p.) and placed in a stereotaxic frame for probe implantation in the dorsal raphe (DR) according to the 'Mouse brains' atlas (Franklin and Paxinos, 2007): coordinates from Bregma (in mm): anterior, – 4.5; lateral, 0; ventral; 3.0. Animals were allowed to recover from surgery overnight. The next day,

~20 h after the surgery, probes were continuously perfused with artificial cerebrospinal fluid (composition in mmol/L: NaCl 147, KCl 3.5, CaCl₂ 1.26, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.0, pH 7.4 ± 0.2) at a flow rate of 1 µl/min using CMA/100 pump (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden). Dialysates were collected every 30 min in small Eppendorf tubes for the measurements of their 5-HT contents ([5-HT]_{ext}) using a high performance liquid chromatography (HPLC) system. Four fractions were collected to measure basal values (means ± SEM) and 4 subsequent fractions were collected after administration of 8-OHDPAT (100 µg/kg; s.c.). The limit of sensitivity for [5-HT]_{ext} was 0.5 fmol per sample (signal-to-noise ratio : 2). At the end of the experiments, the placement of microdialysis probes was verified histologically.

Data analysis and statistics.

Results from data analyses were expressed as mean ± SEM of body temperature (behavior), of DR 5-HT firing rate (electrophysiology) and of [5-HT]_{ext} in the DR (neurochemistry). Two-way ANOVAs were applied for the statistical analyses of the data with pre-treatment (vehicle vs corticosterone) and treatment (vehicle vs fluoxetine) as main factors. In all cases, when appropriate, pairwise comparisons were performed using the Protected at Least Significance (PLSD) post-hoc test using the computer software Stat-View 5.0. Accepted level of significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Because 5-HT_{1A} autoreceptor is a key component in the regulation of serotonergic neurotransmission, the present study examined its functional status after chronic administration of fluoxetine in naive or anxio/depressive mice pre-treated with corticosterone.

In mice, 8-OHDPAT-induced hypothermia is mediated by 5-HT_{1A} autoreceptor (Richardson-Jones et al., 2010). We used this response to assess the functional status of this receptor in our experimental groups. A two-way ANOVA on body temperature revealed a significant effect of pre-treatment [$F(1,36)=15.0$, $p<0.001$] and treatment factors [$F(1,36)=57.8$, $p<0.001$]. 8-OHDPAT significantly decreased the body temperature of vehicle- and corticosterone-pre-treated mice (Figure 1) but this response

was less pronounced in the latter group suggesting a functional desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor. These findings are consistent with initial studies showing that maternal separation or UCMS in rodents (Laaris et al., 1995; Lanfumey et al., 1999; Gartside et al., 2003; Froger et al., 2004; Bambico et al., 2009), reduced 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity. When fluoxetine was given for 28 days, the hypothermic response to 8-OHDPAT was also significantly attenuated in both vehicle- and corticosterone-pre-treated mice (Figure 1), but this blunted response was greater in corticosterone-pre-treated mice.

To confirm the possibility that the effects of fluoxetine on 5-HT_{1A} autoreceptor sensitivity are potentiated in corticosterone-pre-treated mice, we examined the potency of 8-OHDPAT to inhibit the firing activity of DR 5-HT neurons. A two-way ANOVA on the percentage of inhibition of basal 5-HT firing rates induced by 8-OHDPAT, revealed a significant effect of pre-treatment [$F(1,28)=13.3$, $p<0.01$] and treatment factors [$F(1,28)=34.2$; $p<0.001$]. As expected from the above-mentioned behavioral data, 8-OHDPAT was less potent in suppressing 5-HT neuronal firing activity in corticosterone- compared to vehicle-pre-treated mice (ED_{50} were 205 and 110 $\mu\text{g/kg}$, respectively; Figure 2A). When fluoxetine was given for 28 days, the suppression of DR 5-HT neuronal activity induced by 8-OHDPAT was significantly lower in corticosterone-compared to vehicle-pre-treated mice (Figures 2A-2C). Having established that the potency of fluoxetine to desensitize 5-HT_{1A} autoreceptor is enhanced in corticosterone-pre-treated mice, we then determined whether this adaptive change influenced the basal firing rate and the number of spontaneously active 5-HT neurons in the DR. A two-way ANOVA on the basal firing rate of DR 5-HT neurons revealed a significant effect of pre-treatment [$F(1,186)=3.6$, $p<0.05$] and treatment factors [$F(1,186)=28.5$, $p<0.001$]. Figures 2C and 2D show that the mean firing activity of DR 5-HT neurons is similar between vehicle- and corticosterone-pre-treated mice (1.8 ± 0.1 Hz and 2.1 ± 0.1 Hz; $p>0.05$, respectively). This stands in contrast with recent data reporting that the mean spontaneous single-spike firing rate of 5-HT neurons in rats submitted to UCMS was lower than that of the control group (Bambico et al., 2009). Nevertheless, our results concur with data reporting that the basal firing rate of DR 5-HT neurons in rats is not affected by chronic corticosterone treatment despite the desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor

(Fairchild et al., 2003). It thus appears that the degree of stress may play a major role in the regulation of DR 5-HT neuronal activity. Consistent with this hypothesis, Bambico et al. (2009) reported that chronic unpredictable stress reduced the firing rate of DR 5-HT neurons while acute restraint stress failed to do so. In the present study, the observation that the basal DR 5-HT neurons firing rate was not altered in corticosterone mice despite the desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor may be attributable to the lack of tonic activation of this receptor *in vivo* (Bortolozzi et al., 2004; Guilloux et al., 2006). It is also possible that compensatory mechanisms such as a hypersensitization of the terminal 5-HT_{1B} autoreceptor occurred (Gur et al., 2001). After 28 days of treatment with fluoxetine, a significant decrease in the firing activity of 5-HT neurons was observed in vehicle- (1.1 ± 0.1 Hz), but was no longer present in corticosterone-pre-treated mice (2.3 ± 0.2 Hz) when compared to corresponding groups of mice administered with vehicle (Figures 2C-D). Thus, the recovery in firing rate of DR 5-HT neurons returned here to baseline after 28 days of fluoxetine treatment specifically in corticosterone-pre-treated mice. Hence, one of the most remarkable results obtained herein is the observation that the combination of both agents produced additional effects allowing 5-HT neurons to regain their baseline more rapidly when it has been first sensitized (or activated) by the elevated corticosterone levels. This result is in agreement with a robust desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor and suggests that pathological conditions are necessary for fluoxetine to produce its optimal electrophysiological effects. With respect to the number of spontaneous active DR 5-HT neurons, a two-way ANOVA revealed no significant effect of pre-treatment [$F(1,13)=1.1$, $p>0.05$] and treatment [$F(1,15)=0.7$, $p>0.05$] factors. The number of neurons recorded per electrode descent is known as a valid, indirect index of the percentage of neurons that are spontaneously discharging (active) during *in vivo* electrophysiological recordings. Nevertheless, in the present study the number of spontaneously active DR 5-HT neurons was not modified either by corticosterone and/or fluoxetine treatments (Table 1).

Having observed electrophysiological differences between corticosterone- and vehicle-pre-treated mice administered with fluoxetine on the sensitivity of 5-HT_{1A} autoreceptor, we next asked how these differences are reflected at the neurochemical level by using *in vivo*

microdialysis at somatodendritic level (i.e., in the DR). A two-way ANOVA on the percentage of inhibition of 5-HT extracellular levels induced by 8-OHDPAT, revealed a significant effect of pre-treatment [$F(1,16)=12.1$, $p<0.01$] and treatment factors [$F(1,16)=5.1$, $p<0.05$]. Our results show that the decrease in the extracellular levels of 5-HT in the DR induced by 8-OHDPAT was significantly lower in corticosterone- than in vehicle-pre-treated mice administered with fluoxetine (Figures 3A-B). Once again, our results emphasize the fact that the functional desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor in response to fluoxetine is potentiated in corticosterone-pre-treated mice. Regarding basal extracellular levels of 5-HT in the DR, a two-way ANOVA revealed no significant effect of pre-treatment [$F(1,16)=1.7$, $p>0.05$], but a significant effect of treatment factors [$F(1,16)=28.6$, $p<0.001$]. The absence of differences on the basal extracellular levels of 5-HT in the DR between vehicle- and corticosterone-pre-treated mice is consistent with electrophysiological data. As expected, fluoxetine significantly increased basal extracellular levels of 5-HT in the DR in both vehicle and corticosterone-pre-treated mice (Table 2), with a trend of higher increase in the corticosterone group of mice. These findings raise the possibility that the degree of increase in 5-HT levels in the vicinity of 5-HT cell bodies might account for the differential degree of desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor. This neurochemical observation concurs with a higher firing rate of DR 5-HT neurons and a more pronounced desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor in corticosterone- compared to vehicle-pre-treated mice in response to fluoxetine. However, previous microdialysis data failed to detect differences in basal cortical extracellular levels of 5-HT between sham and corticosterone-treated rats after chronic fluoxetine administration (Gartside et al., 2003). It is thus possible that the nature of the neurochemical effects of corticosterone on extracellular levels of 5-HT may depend on the brain region studied (somatodendritic vs terminal areas), the mode of corticosterone administration (drinking water vs pellet) and/or the species studied (rats vs mice).

The present study performed in mice demonstrates that chronic administration of corticosterone in the drinking water i) produces a functional desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor without affecting the basal firing rate or extracellular levels of 5-HT in the DR, ii) potentiates fluoxetine-induced desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor.

Such mechanism is in favor of a greater enhancement of brain serotonergic neurotransmission and would thus represents a plausible explanation of the antidepressant-like effects of SSRI, specifically in animal models of anxiety/depression. Several hypotheses may explain the fact that corticosterone desensitized 5-HT_{1A} autoreceptor and potentiated the behavioral, electrophysiological and neurochemical effects of fluoxetine. It is possible that corticosterone directly downregulated the expression of 5-HT_{1A} autoreceptor. *In situ* hybridization and immunocytochemical studies have revealed the presence of Glucocorticoid Receptor (GR) mRNA or protein specifically within 5-HT cell bodies in the DR (Härfstrand et al., 1986) while the 5-HT_{1A} receptor gene includes a glucocorticoid responsive element (GRE) (Ou et al., 2001). Therefore, corticosterone might have desensitized somatodendritic autoreceptor through a mechanism independently to an increase in extracellular 5-HT levels in the DR. Interestingly, it was shown that corticosterone significantly reduced the expression of mRNA encoding G-protein linked inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channel (Fairchild et al., 2003) suggesting that the desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptor induced by corticosterone could result from an alteration in their coupling property. Another possibility would be that corticosterone increased the activity of the tryptophan hydroxylase. The activation of TpH would thus result in an increase in 5-HT release at somatodendritic levels, thereby facilitating the functional inactivation of 5-HT_{1A} autoreceptor. Nevertheless, in the present study although corticosterone enhanced the effect of fluoxetine on basal extracellular levels of 5-HT, it had no effect on this parameter when given alone. Finally we cannot rule out the possibility that corticosterone, as observed with SSRIs, decreased 5-HT reuptake. In line with this hypothesis, a recent study has shown that corticosterone blocks the reuptake of 5-HT through low-affinity monoamine transporters (Baganz et al., 2010). This point should draw our attention for future investigations.

CONFLICT OF INTEREST: None

ACKNOWLEDGMENTS

The Department of Neuropharmacology is an “Equipe d’accueil” (EA 3544) from the ‘Ministère de la Jeunesse, de l’Education Nationale et de la Recherche’ (MJENR-

France). Q.R. and G.Q. are recipients of a fellowship from the French Ministry for Research. H.T.N is a recipient of a fellowship from the french embassy in Vietnam. This work has been supported by the technical assistance of Valerie Dupont-Domergue and all her staff from the animal care facility of the Institut Fédératif de Recherche-IFR141 of the Paris XI University.

REFERENCES

- Aghajanian GK and Vandermaelen CP (1982) Intracellular identification of central noradrenergic and serotonergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci* **2**:1786-1792.
- Baganz N, Horton R, Martin K, Holmes A and Daws LC (2010) Repeated swim impairs serotonin clearance via a corticosterone-sensitive mechanism: organic cation transporter 3, the smoking gun. *J Neurosci* **30**:15185-15195.
- Bambico FR, Nguyen NT and Gobbi G (2009) Decline in serotonergic firing activity and desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors after chronic unpredictable stress. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**:215-228.
- Blier P and De Montigny C (1987) Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse* **1**:470-480.
- Bortolozzi A, Amargos-Bosch M, Toth M, Artigas F and Adell A (2004) In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J Neurochem* **88**:1373-1379.
- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, Mendez I, Drew M, Craig DA, Guiard BP, Guilloux JP, Artymyshyn RP, Gardier AM, Gerald C, Antonijevic IA, Leonardo ED and Hen R (2009) Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron* **62**:479-493.
- El Yacoubi M, Bouali S, Popa D, Naudon L, Leroux-Nicollet I, Hamon M, Costentin J, Adrien J and Vaugeois JM (2003) Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:6227-6232.
- Evrard A, Barden N, Hamon M and Adrien J (2006) Glucocorticoid receptor-dependent desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by sleep deprivation: studies in GR-1 transgenic mice. *Sleep* **29**:31-36.
- Fairchild G, Leitch MM and Ingram CD (2003) Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology* **45**:925-934.
- Farley S, Apazoglou K, Witkin JM, Giros B and Tzavara ET (2010) Antidepressant-like effects of an AMPA receptor potentiator under a chronic mild stress paradigm. *Int J Neuropsychopharmacol* **13**:1207-1218.
- Franklin KBJ and Paxinos F (2007) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 3rd edn. New York: Elsevier.
- Froger N, Palazzo E, Boni C, Hanoun N, Saurini F, Joubert C, Dutriez-Casteloot I, Enache M, Maccari S, Barden N, Cohen-Salmon C, Hamon M and Lanfumey L (2004) Neurochemical and behavioral alterations in glucocorticoid receptor-impaired transgenic mice after chronic mild stress. *J Neurosci* **24**:2787-2796.
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F (1996) Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol* **10**:16-27.
- Gartside SE, Leitch MM and Young AH (2003) Altered glucocorticoid rhythm attenuates the ability of a chronic SSRI to elevate forebrain 5-HT: implications for the treatment of depression. *Neuropsychopharmacology* **28**:1572-1578.
- Gourley SL, Wu FJ, Kiraly DD, Ploski JE, Kedves AT, Duman RS, Taylor JR (2008) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant-sensitive chronic depression. *Biol Psychiatry* **63**:353-359.
- Gourley SL and Taylor JR (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Neuropsychopharmacology* **34**:707-716.
- Greenwood BN, Foley TE, Day HE, Campisi J, Hammack SH, Campeau S, Maier SF and Fleshner M (2003) Free-wheel running prevents learned helplessness/behavioral depression: role of dorsal raphe serotonergic neurons. *J Neurosci* **23**:2889-2898.
- Grippio AJ, Sullivan NR, Damjanoska KJ, Crane JW, Carrasco GA, Shi J, Chen Z, Garcia F, Muma NA and Van de Kar LD (2005) Chronic mild stress induces behavioral and physiological changes, and may alter serotonin 1A receptor function, in male and cycling

- female rats. *Psychopharmacology (Berl)* **179**:769-780.
- Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Reperant C, Toth M, Bourin M and Gardier AM (2006) Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **31**:2162-2172.
- Gur E, Dremencov E, Lerer B, Newman ME (2001) Functional effects of corticosterone on 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor activity in rat brain: in vivo microdialysis studies. *Eur J Pharmacol* **411**:115-122.
- Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, Wikstrom AC, Okret S, Yu ZY, Goldstein M, Steinbusch H and et al. (1986) Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:9779-9783.
- Hensler JG, Advani T and Monteggia LM (2007) Regulation of serotonin-1A receptor function in inducible brain-derived neurotrophic factor knockout mice after administration of corticosterone. *Biol Psychiatry* **62**:521-529.
- Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* **23**:477-501.
- Lanfume Y L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, Hamon M and Cohen-Salmon C (1999) 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. *Neuroreport* **10**:3369-3374.
- Le Francois B, Czesak M, Steubl D and Albert PR (2008) Transcriptional regulation at a HTR1A polymorphism associated with mental illness. *Neuropharmacology* **55**:977-985.
- Leitch MM, Ingram CD, Young AH, McQuade R and Gartside SE (2003) Flattening the corticosterone rhythm attenuates 5-HT_{1A} autoreceptor function in the rat: relevance for depression. *Neuropsychopharmacology* **28**:119-125.
- Lemond S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM and Albert PR (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. *J Neurosci* **23**:8788-8799.
- Malagie I, Trillat AC, Douvier E, Anmella MC, Dessalles MC, Jacquot C and Gardier AM (1996) Regional differences in the effect of the combined treatment of WAY 100635 and fluoxetine: an in vivo microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**:785-790.
- McAllister-Williams RH, Massey AE and Fairchild G (2007) Repeated cortisol administration attenuates the EEG response to buspirone in healthy volunteers: evidence for desensitization of the 5-HT_{1A} autoreceptor. *J Psychopharmacol* **21**:826-832.
- Nemeroff CB and Vale WW (2005) The neurobiology of depression: inroads to treatment and new drug discovery. *J Clin Psychiatry* **66 Suppl** 7:5-13.
- Novati A, Roman V, Cetin T, Hagewoud R, den Boer JA, Luiten PG and Meerlo P (2008) Chronically restricted sleep leads to depression-like changes in neurotransmitter receptor sensitivity and neuroendocrine stress reactivity in rats. *Sleep* **31**:1579-1585.
- Ou XM, Storing JM, Kushwaha N and Albert PR (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT_{1A} receptor gene. *J Biol Chem* **276**:14299-14307.
- Pineda EA, Hensler JG, Sankar R, Shin D, Burke TF and Mazarati AM (2011) Plasticity of presynaptic and postsynaptic serotonin 1A receptors in an animal model of epilepsy-associated depression. *Neuropsychopharmacology* **36**:1305-1316.
- Richardson-Jones JW, Craig CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, Gardier AM, Dranovsky A, David DJ, Beck SG, Hen R and Leonardo ED (2010) 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* **65**:40-52.
- Stern EY, Kalynchuk LE (2010) Behavioral and neurological consequences of glucocorticoid exposure in rats: relevance to depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **34**:777-790.
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L and Rajkowska G (1998) Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* **18**:7394-7401.
- Surget A, Wang Y, Leman S, Ibarguen-Vargas Y, Edgar N, Griebel G, Belzung C and Sibille E (2009) Corticolimbic transcriptome changes are state-dependent and region-specific in a rodent model of depression and of antidepressant reversal. *Neuropsychopharmacology* **34**:1363-1380.

Van der Heyden JAM, Zethof TJJ and Olivier B (1997)
Stress-induced hyperthermia in singly housed mice.
Physiol. Behav **62**:63–70.

Van Riel E, van Gemert NG, Meijer OC and Joels M (2004)
Effect of early life stress on serotonin responses in the

hippocampus of young adult rats. *Synapse* **53**:11-19.

Young AH, Sharpley AL, Campling GM, Hockney RA and
Cowen PJ (1994b) Effects of hydrocortisone on brain 5-
HT function and sleep. *J Affect Disord* **32**:139-146.

TABLES

TABLE 1: Effect of sustained corticosterone $\pm$ fluoxetine on the number of spontaneously active DR 5-HT neurons.

Pretreatment	Treatment	Number of neuron/tract
Vehicle (β -CD 0.45%)	Vehicle	3.1 ± 0.6
Vehicle (β -CD 0.45%)	Fluoxetine (18 mg/kg/d)	2.7 ± 0.2
Corticosterone (35 μ g/ml/d)	Vehicle	3.5 ± 0.3
Corticosterone (35 μ g/ml/d)	Fluoxetine (18 mg/kg/d)	2.9 ± 0.3

TABLE 2: Basal extracellular 5-HT levels in the DR in vehicle.vehicle; vehicle.fluoxetine, corticosterone/vehicle and corticosterone.fluoxetine groups of mice. Data are the mean $\pm$ SEM calculated from 4 baseline samples. **p<0.01 and ***p<0.001: significantly different from the corresponding group of mice treated with vehicle (VEH). (n=4-6 mice per group).

Pretreatment	Treatment	Basal extracellular 5-HT in the DR (fmol)
Vehicle (β -CD 0.45%)	Vehicle	13.4 ± 4.1
Vehicle (β -CD 0.45%)	Fluoxetine (18 mg/kg/d)	$75.9 \pm 3.1^{***}$
Corticosterone (35 μ g/ml/d)	Vehicle	14.8 ± 3.6
Corticosterone (35 μ g/ml/d)	Fluoxetine (18 mg/kg/d)	$114.9 \pm 24.1^{**}$

FIGURES

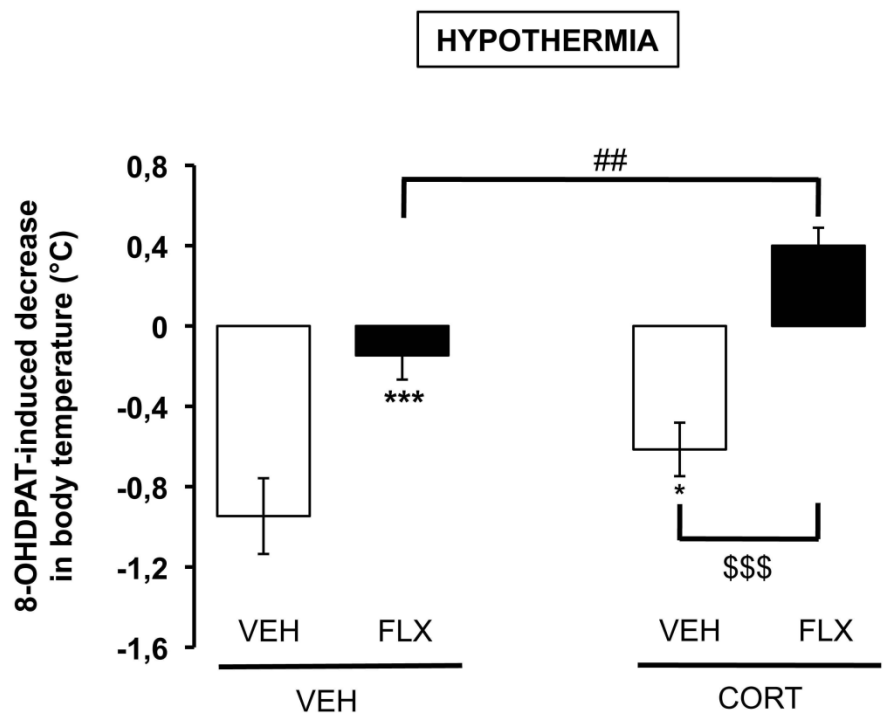


FIGURE 1: Effect of sustained administration of corticosterone ± fluoxetine on 8-OHDPAT-induced hypothermia. Data are means ± SEM of decrease in body temperature (°C) measured 10 min after 8-OHDPAT (100 µg/kg; s.c.) administration. *p<0.05 and ***p<0.001: significantly different from vehicle (VEH) / vehicle (VEH) treated mice. \$\$\$p<0.001: significantly different from vehicle (VEH) / corticosterone (CORT) treated mice. ##p<0.01: significantly different from vehicle (VEH) / fluoxetine (FLX) treated mice (n=10 mice per group).

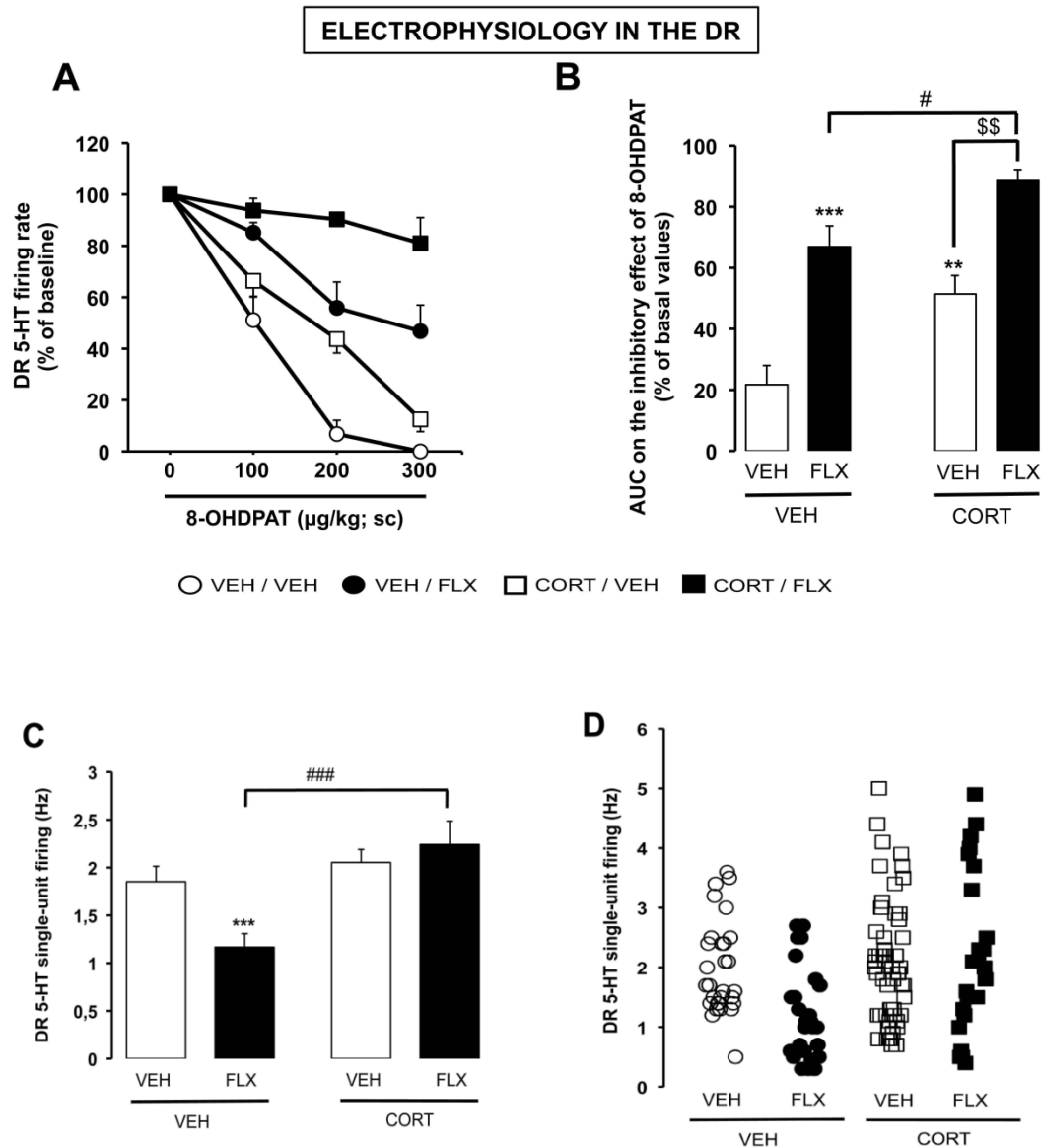


FIGURE 2: Effect of sustained administration of corticosterone $\pm$ fluoxetine on dorsal raphe 5-HT neuronal activity. All dorsal raphe (DR) 5-HT neurons tested were inhibited, in a dose-dependent manner by 8-OHDPAT (100-300 $\mu\text{g/kg}$, s.c.), this inhibition being reversed by the administration of the selective 5-HT_{1A} receptor antagonist WAY100635 (300 $\mu\text{g/kg}$; s.c.). **(A)** Data are means $\pm$ SEM of inhibition in percentage of baseline. These means were measured on the 60-s period preceding each 8-OHDPAT administration in vehicle (VEH)- (○, ●) or corticosterone (CORT)- (□, ■) pre-treated mice administered with vehicle (VEH: white symbols) or fluoxetine (FLX, 18 mg/kg/28days; po: black symbols). **(B)** Data are expressed as area under the curve (AUC; mean $\pm$ SEM). AUC values were calculated for the inhibitory effect of 8-OHDPAT on DR 5-HT neuronal activity and expressed as percentage of baseline. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$: significantly different from vehicle (VEH) / vehicle (VEH) treated mice. \$\$\$ $p < 0.01$: significantly different from vehicle (VEH) / corticosterone (CORT) treated mice. # $p < 0.05$: significantly different from vehicle (VEH) / fluoxetine (FLX) treated mice ($n = 4-6$ mice per group). ($n = 5-9$ mice per group). **(C)** Data are means $\pm$ SEM firing rate in Hertz (Hz) ($n = 3-7$ mice per treatment group). *** $p < 0.001$, significantly different from the firing rate of DR 5-HT neurons in vehicle (VEH) / vehicle (VEH) treated mice. ### $p < 0.001$, significantly different from vehicle (VEH) / fluoxetine (FLX) treated mice. **(D)** Distribution of 5-HT single spike firing activity per treatment group.

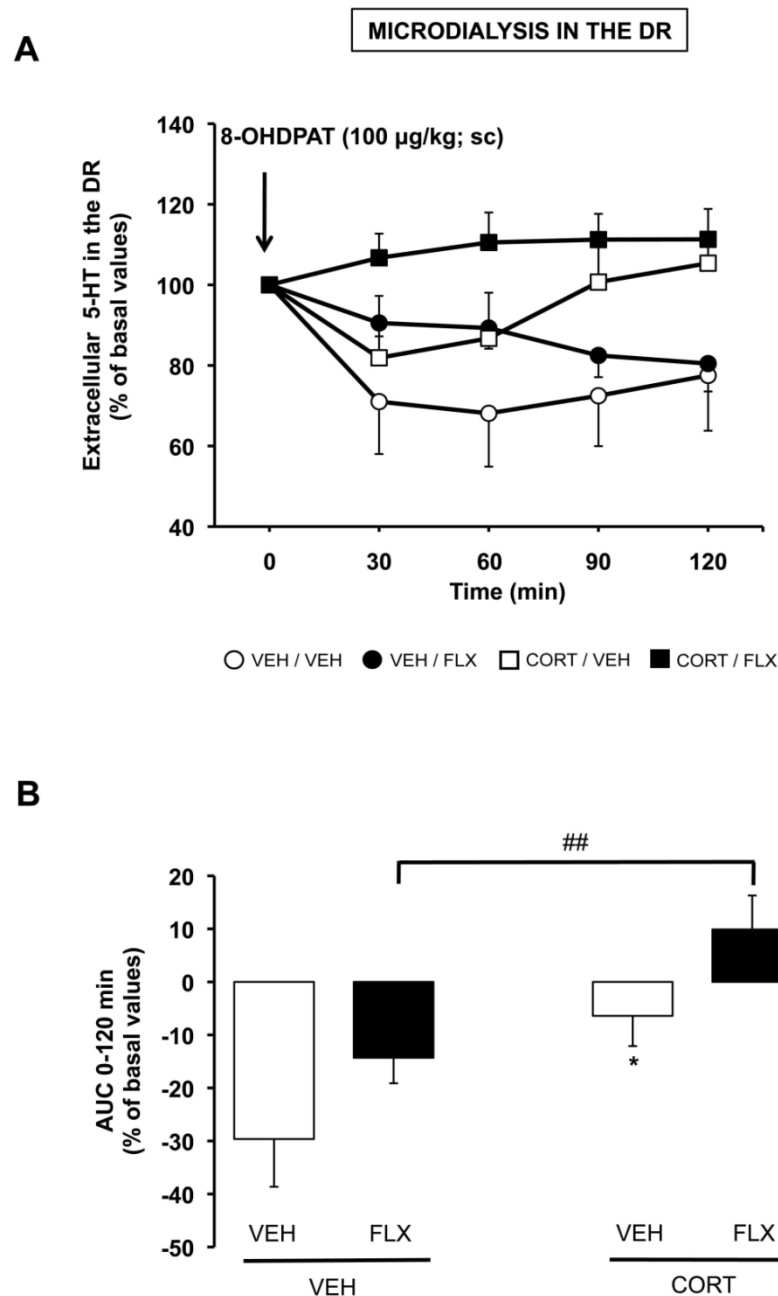


FIGURE 3: Effect of sustained corticosterone $\pm$ fluoxetine on extracellular levels of 5-HT in the dorsal raphe. (A): Effect of systemic administration of 8-OH-DPAT on extracellular levels of 5-HT ([5-HT]_{ext}) in the dorsal raphe (DR) in vehicle (VEH)-(○, ●) or corticosterone (CORT)-(□, ■) pre-treated mice administered with vehicle (VEH: white symbols) or fluoxetine (FLX, 18 mg/kg/28days; po: black symbols). Results are expressed as means $\pm$ SEM of [5-HT]_{ext} (percentages of basal values). Mice received (arrow) 8-OH-DPAT (100 μ g/kg; s.c.). **(B)** Data are expressed as area under the curve (AUC; mean $\pm$ SEM). AUC values were calculated for the amount of 5-HT outflow measured in the DR during the 0–120 min post-treatment period with the 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT and expressed as percentages of baseline. * p <0.05: significantly different from vehicle (VEH) /vehicle (VEH) treated mice. ## p <0.01: significantly different from vehicle (VEH) / fluoxetine (FLX) treated mice (n=4-6 mice per group).

ARTICLE 5: Blocage du transporteur de la noradrénaline par le escitalopram: étude de microdialyse *in vivo* chez la souris

Hai Thanh Nguyen, Bruno P. Guiard, Alexandre Bacq, Denis J. David, Indira David, Gaël Quesseveur, Sophie Gautron, Connie Sanchez, Alain M. Gardier

Soumis

Résumé: Le but de cette étude visait à déterminer les effets de l'administration aiguë de escitalopram, sur les concentrations extracellulaires corticales de 5-HT ([5-HT]_{ext}) et de NA ([NA]_{ext}) chez des souris contrôles et/ou mutantes, privées du transporteur SERT de la 5-HT (SERT^{-/-}). Plus particulièrement, ce travail avait pour objectif de préciser si les effets neurochimiques du escitalopram sur les [NA]_{ext} résultait d'un mécanisme impliquant l'inhibition directe du transporteur NAT de la NA, ou d'un mécanisme indirect mettant en jeu une élévation initiale des [5-HT]_{ext}.

Principaux résultats

- Chez les souris contrôles, l'administration d'une dose unique, systémique ou locale de escitalopram (dans le cortex frontal : FCx) a produit une augmentation significative des [5-HT]_{ext} mais également de [NA]_{ext}. Dans le test de la nage forcée (FST), le escitalopram a augmenté le paramètre de nage (un indice d'activation du système sérotoninergique), sans affecter le comportement d'escalade (un indice d'activation du système noradrénergique).

- De manière intéressante, dans le FCx, le escitalopram n'a pas augmenté les [5-HT]_{ext} des souris SERT^{-/-} tandis que ses effets neurochimiques sur les [NA]_{ext} ont persisté chez ces mutants. En accord avec l'hypothèse d'un blocage du NAT par le escitalopram, nous avons montré que les effets du escitalopram sur les [NA]_{ext} corticales ont été prévenu par le blocage pharmacologique du NAT à l'aide de la desipramine chez les souris contrôles.

- Enfin, lors d'expériences réalisées *ex vivo* sur des homogénats de cortex de souris, le escitalopram n'a eu aucun effet sur la recapture de la NA via le transporteur de faible affinité OCT2,

Conclusion

L'ensemble de ces résultats suggère qu'à fortes doses, le escitalopram augmente modérément les [NA]_{ext} *in vivo*, par un mécanisme non sélectif impliquant, très probablement, l'inhibition du transporteur NAT de la NA.

ABSTRACT

Background and Purpose: Escitalopram, the S(+)-enantiomer of citalopram is the most selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitor approved. Although all serotonin selective reuptake inhibitors (SSRIs) increase extracellular levels of serotonin ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$), some of them also enhance, to a lower extent, the extracellular levels of norepinephrine ($[NE]_{\text{ext}}$). However, the mechanisms by which SSRIs activate noradrenergic transmission in the brain remain to be determined. **Experimental approach:** This study aimed at examining the effects of escitalopram, on both $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[NE]_{\text{ext}}$ in the frontal cortex (FCx) of freely moving wild-type (WT) and mutant mice lacking the 5-HT transporter ($\text{SERT}^{-/-}$) by using intracerebral microdialysis. In particular, the possibilities that escitalopram enhances $[NE]_{\text{ext}}$ either by a direct mechanism involving the inhibition of the low- or high-affinity NE transporters, or by an indirect mechanism promoted by $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ elevation were explored. The forced swim test (FST) was used to investigate whether enhancing cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and/or $[NE]_{\text{ext}}$ affected the antidepressant-like activity of escitalopram. **Key results:** In WT mice, a single systemic administration of escitalopram produced a significant increase in cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[NE]_{\text{ext}}$. As expected, escitalopram failed to increase cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ in $\text{SERT}^{-/-}$ mice whereas its neurochemical effects on $[NE]_{\text{ext}}$ persisted in these mutants. In WT mice submitted to the FST, escitalopram increased swimming parameter without affecting climbing behavior. Finally, escitalopram, at relevant concentrations, failed to inhibit cortical NE and 5-HT uptake mediated by low-affinity monoamine transporters. **Conclusions and implications:** These experiments suggest that escitalopram enhances, although moderately, cortical $[NE]_{\text{ext}}$ *in vivo* by a direct mechanism involving the inhibition of the high-affinity NE transporter (NET).

Keywords: antidepressant; behavior; escitalopram; intracerebral microdialysis; frontal cortex; serotonin selective reuptake inhibitor; serotonin transporter, norepinephrine.

INTRODUCTION

Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) have been proven effective in the treatment of depression. This class of antidepressant drugs exerts their therapeutic effects by inhibiting the reuptake of serotonin (5-HT), thereby prolonging its duration of action at postsynaptic levels (Frazer, 2001). Although many patients benefit from SSRIs, approximately 50% of depressive individuals do not respond adequately to these agents (Berton and Nestler, 2006). The SSRI escitalopram is the active S(+)-enantiomer of the racemic citalopram responsible for its inhibitory action on 5-HT reuptake (Sánchez *et al.*, 2003a; Jacquot *et al.*, 2007). *In vitro* studies on embryonic kidney cells heterologously expressing the human monoaminergic transporters have demonstrated that the affinity of escitalopram for the 5-HT transporter (SERT) is much greater than for the norepinephrine transporter (NET) or the dopamine transporter (DAT) (K_i values: 1.1; 7841 and 27410 nM, respectively) (Owens *et al.*, 2001). These data were confirmed in functional studies from rat brain synaptosomes showing that escitalopram blocks the NET and DAT with marginal potency (Sanchez *et al.*, 2003a). Consistent with its potent inhibitory action on the SERT, *in vivo* studies have reported that an acute administration of escitalopram suppressed the firing rate of dorsal raphe (DR) 5-HT neurons in rats with an ED_{50} of $60 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (El Mansari *et al.*, 2005). Escitalopram was also shown to enhance extracellular 5-HT levels in the rat frontal cortex (FCx) (Mørk *et al.*, 2003) and produce antidepressant/anxiolytic-like effects in various animal paradigms (Sanchez *et al.*, 2003a,b). Interestingly, these electrophysiological, neurochemical and behavioral responses are partially inhibited by R(-)-citalopram (Mørk *et al.*, 2003; Sanchez *et al.*, 2003a,b; El Mansari *et al.*, 2005). After sustained administration, escitalopram produced a faster desensitization of somatodendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in the DR than citalopram (El Mansari *et al.*, 2005), an effect that probably accounts for the robust increase in cortical extracellular 5-HT levels ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) observed after only 2 weeks of treatment (Ceglia *et al.*, 2004). In human, escitalopram demonstrates a rapid onset of antidepressant action and recent data suggest that it may be more effective than other SSRIs and at least as effective as dual 5-HT/NE reuptake inhibitors in major depression (Kennedy *et al.*, 2009; Kornstein *et al.*, 2009; Garnock-

Jones *et al.*, 2010). Interestingly, it has been demonstrated that SSRIs such as paroxetine, fluoxetine and citalopram can also inhibit uptake of [^3H]NE in rat cortical synaptosomes *in vitro* (Hughes and Stanford, 1996) and consequently enhance extracellular NE levels ($[\text{NE}]_{\text{ext}}$) in the FCx and hippocampus after acute administration in rodents (Jordan *et al.*, 1994; Shachar *et al.*, 1997; Millan *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 2002; Bymaster *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2002; David *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008). Although this property seems to be a common feature of SSRIs *in vivo* in rodents, it is still unknown whether SSRIs and more particularly escitalopram enhance the level of $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ by a direct mechanism involving the inhibition of the high-affinity NE transporter, or by an indirect mechanism in response to increases in $[\text{5-HT}]_{\text{ext}}$.

Anatomical and functional studies have demonstrated that 5-HT and NE have reciprocal interactions at both somatodendritic and nerve terminal levels. Locus coeruleus (LC), the major NE brainstem nucleus, sends projections into the DR, while the DR projects into the LC, creating ample opportunity for cross-modulation (Pudovkina *et al.*, 2002; Guiard *et al.*, 2008a). The physiological importance of such connections is evidenced, for example, by the observation that SSRIs modulate the activity of noradrenergic neurons. Escitalopram, but also the other SSRIs can decrease the spontaneous neuronal activity of LC NE neurons through the local activation of postsynaptic 5-HT $_{2A/C}$ receptors (Szabo and Blier 2001a,b; Dremencov *et al.*, 2007; Miguelez *et al.*, 2009). Since it is difficult to reconcile these electrophysiological data with the fact that SSRIs increase $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ at nerve terminals, the present study was aimed to evaluate the effects of an acute administration of escitalopram on cortical extracellular levels of both 5-HT and NE by using intracerebral microdialysis in awake freely moving wild-type (WT) and knockout mice lacking the 5-HT transporter ($\text{SERT}^{-/-}$).

The main results presented herein show that the acute systemic administration or local injection of escitalopram in the FCx significantly increased both the extracellular levels of 5-HT and NE in the FCx of WT mice. Unexpectedly, the ability of escitalopram to increase cortical NE levels remained effective in $\text{SERT}^{-/-}$ mice but not in $\text{SERT}^{+/+}$ administered with desipramine suggesting that this SSRI, previously considered highly selective for SERT, may also unselectively block the norepinephrine transporter (NET) at high doses.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Male wild-type (WT) and serotonin transporter knockout ($\text{SERT}^{-/-}$) mice, 4–6 months old, weighing 25–35 g, were used in this study. Mutant mice originally produced by homologous recombination (Bengel *et al.*, 1998) were housed in our animal care facility in groups of 3–6 and kept under standard conditions (room temperature of 22–23°C, 12:12 light–dark cycle, free access to food and water). Mice were tested between 9.00 a.m. and 5.00 p.m. during the light phase. Procedures were conducted in conformity with the institutional guidelines in compliance with national policy (Council directive #87–848, October 19, 1987, Ministère de l'Agriculture et de la Forêt, Service Vétérinaire de la Santé et de la Protection Animale, permissions #005037 to A.M. Gardier).

Drugs and administration

Escitalopram oxalate (H. Lundbeck A/S, Denmark) was administered by the intraperitoneal (i.p.) route at a dose of 4, 8 or 16 mg·kg $^{-1}$. In reverse microdialysis experiments, escitalopram (0.5 μM) or desipramine (50 or 100 μM) were dissolved in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) and then perfused locally into the FCx. The concentration of escitalopram was chosen on the basis of previous microdialysis experiments showing that the perfusion of 1 μM of the racemic compound (i.e. citalopram) into the FCx produced a significant increase in local extracellular 5-HT levels in mice (Guilloux *et al.*, 2006). The concentration of desipramine was selected on the basis of its previously reported enhancing effect on extracellular NE levels in mice (Fischer *et al.*, 2007).

Microdialysis procedure

Mice anaesthetized with chloral hydrate (400 mg·kg $^{-1}$; i.p.), were implanted with probes (CMA7 model, Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden) located in the FCx (stereotaxic coordinates in mm from bregma (Hof *et al.*, 2000): A= +1.6, L= +1.3, V= -1.6; A, anterior; L, lateral; and V, ventral) (Guilloux *et al.*, 2006). Animals were allowed to recover from the surgery overnight. The next day, $\approx$ 20h after surgery, the probes were continuously perfused with aCSF (composition in mmol/L: NaCl 147, KCl 3.5, CaCl $_2$ 1.26, MgCl $_2$ 1.2, NaH $_2$ PO $_4$ 1.0, pH 7.4 $\pm$ 0.2) at a flow rate of 1.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ in cortex using CMA/100

pump (Carnegie Medicin, Stockholm, Sweden), while animals were awake and freely moving in their cage. One hour after the start of aCSF perfusion stabilization period, four fractions were collected (one every 20 min) to measure the basal values (mean $\pm$ S.E.M. corresponding to B_0 at t_0) calculated for each mouse before systemic administration or local perfusion of vehicle, escitalopram or desipramine. Subsequent dialysate samples were then collected for a 0-120 or 0-240 min post-treatment period and analyzed for 5-HT and NE by a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (XL-ODS, 4.6 x 75 mm, particle size 3 μ m; Beckman) coupled to an amperometric detector (1049 A, Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The mobile phase for 5-HT and NE contained 107 or 100 mM NaH_2PO_4 , 140 or 151 μ M disodium EDTA; 0.77 or 3 mM I-octanesulphonic acid; respectively, and 20% (v/v) methanol (pH adjusted between 4.1 and 4.3 with phosphoric acid). Its flow rate through the HPLC column was set at 0.7 mL/min using a 118 pump (Beckman). The limit of sensitivity for 5-HT or NE was $\approx$ 0.5 fmol/sample (signal-to-noise ratio=2). At the end of the experiments, localization of microdialysis probes was verified histologically (Bert *et al.*, 2004; Guilloux *et al.*, 2006).

Forced Swimming Test procedure

The Forced Swimming Test (FST) was performed in independent groups of mice from microdialysis experiments. FST procedure was modified to enhance the sensitivity for detecting the putative antidepressant-like activity of drugs (Porsolt *et al.*, 1977; Holick *et al.*, 2008). Mice were briefly placed into clear plastic buckets, 20 cm in diameter and 23 cm deep filled 2/3 with water at 23-25°C. Automated scoring was performed using the automated X'PERT FST (Bioseb, Vitrolles, France). Each bucket was instrumented with a sensor recording the vibrations due to movements of the mice and a video was recorded from above. The system synchronizes mice position, data calculated from the video recording, and the vibration data. This information allows the system to compute characteristic values (based on speed of the animal, as well as different frequencies and powers of the vibrations through Fast Fourier Transform calculation) describing the animal behavior every second. Dependent variables were mobility, swimming and climbing duration. This test was performed 30-min after drug administration. The mobility duration is an index of antidepressant-like

activity. Swimming behavior relies on the serotonergic system, and climbing behavior on the noradrenergic system in mice (Dulawa *et al.*, 2004, Holick *et al.*, 2008).

Monoamine uptake.

Male WT mice (Janvier, St Berthevin, France) were euthanized by decapitation and the FCx was dissected, minced on ice and resuspended in 10 volumes (wt/vol) of ice-cold sucrose (0.32 M). The cells were dissociated by filtering through nylon mesh of decreasing pore size (180 to 60 μ m, Small Parts, Miramar, FL, USA) and resuspended in ice-cold sucrose. The cellular suspension was preincubated 10 min at 37 °C in 3 vol of Krebs Ringer HEPES (KRH) LiCl buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 125 mM LiCl, 4.8 mM KCl, 5.6 mM D(+)-glucose, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 and 1.2 mM MgSO_4). To specifically determine the potential role played by low-affinity monoamine transporters in the effects of escitalopram on 5-HT and NE, we examined the uptake of radiolabeled 5-HT and NE in cellular suspensions treated with inhibitors of the high-affinity monoamine transporters such as 10 μ M of venlafaxine (Tocris Bioscience, Bristol, UK), 5 μ M of desipramine, 100 μ M of GBR12935 or 10 μ M of pargyline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Reserpine (10 μ M was used to block the vesicular transporter VMAT2 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). These cellular suspensions were incubated for 15 min at 37 °C in the same buffer supplemented with 10 μ M [^3H]NE, [^3H]5-HT (Perkin Elmer, Boston, MA, USA). The effect of escitalopram on endogenous low-affinity transporter activity was evaluated in the presence of increasing concentrations of this antidepressant (0.1–10 mM) during pre-incubation and uptake. The reaction was terminated by rapid filtration through Unifilter-96 GF/C filters (Perkin Elmer), the cells were washed four times with 3 vol of uptake buffer and the radioactivity retained on the filters was assessed by liquid scintillation. The protein concentration in tissue extracts was measured by the method of Bradford standardized with bovine serum albumin. Low-affinity transporter-mediated uptake was quantified by inhibition with the specific inhibitor decynium 22 (D22: 1,1'-diethyl-2,2'-cyanine iodide) (500 μ M; Sigma-Aldrich). Data are expressed as mean $\pm$ S.E.M. of low-affinity uptake from one experiment performed in triplicate. D22-sensitive uptake rates were defined by subtracting uptake in the presence of D22 from the uptake observed in its absence (D22 uptake fraction $\pm$

escitalopram was subtracted from the control fraction $\pm$ escitalopram) and were expressed as mean $\pm$ S.E.M. of D22-sensitive uptake from 3–4 independent experiments.

Data statistical analysis

Statistical analyses were performed using the computer software StatView 5.0. (Abacus Concepts, Inc., Berkley, CA, U.S.A.). Statistical comparisons between basal $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ in WT and $\text{SERT}^{-/-}$ mice were made using the non parametric Newman-Keuls test. All others values for microdialysis studies were calculated as percentage change at each time point relative to the average of four baseline values. Significant differences were determined on AUC values using a student-t test or a one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test when appropriate. For behavioral studies, values were calculated on swimming or climbing duration and significant differences were determined on this parameter using a one-way ANOVA followed by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* test when appropriate. With respect to the uptake experiments, one-way ANOVA followed by Fisher Protected Least Significance Difference *post hoc* was applied. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

RESULTS

Basal extracellular levels of 5-HT and NE in the frontal cortex of wild-type (WT) and $\text{SERT}^{-/-}$ mice.

The effects of systemic administration of escitalopram on $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ in the FCx were evaluated by conventional microdialysis. Table 1 shows the means $\pm$ S.E.M. of basal cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ levels (in fmol/20 μ l) in WT and $\text{SERT}^{-/-}$ mice. 5-HT levels were 6-fold higher in $\text{SERT}^{-/-}$ than in WT mice ($p < 0.001$), while NE levels were 2-fold lower ($p < 0.001$).

Effects of systemic administration of escitalopram on cortical dialysate 5-HT and swimming time in the FST in WT mice.

A dose-response experiment was undertaken to determine the effects of systemic administration of escitalopram on $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ in the FCx (Fig. 1 and 2). One-way ANOVA on 5-HT outflow in the FCx measured from AUC values calculated during the 120 min

post-treatment period, revealed significant effects of treatment factor ($F[3,31]=12.19$; $p < 0.001$). Escitalopram increased cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ at the doses of 8 and 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. compared to vehicle-treated mice ($p < 0.001$ and $p < 0.001$, respectively) (Time course Fig. 1A). The maximal increase in AUC values was of $378 \pm 80\%$ of baseline for the dose of 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (Fig. 1B).

FST was carried out in an independent group of mice during the peak of escitalopram effect (30 min after the drug, see grey area in Fig. 1A). The mobility and swimming times were measured during the last 4 min of the 6 min test in mice. One-way ANOVA revealed a significant main effect of escitalopram on mobility ($F[3,35]=6.26$; $p=0.01$) and swimming times ($F[3,35]=6.26$; $p=0.01$; Fig. 1C), thus suggesting an antidepressant-like activity of escitalopram in this paradigm. Escitalopram induced a statistically significant increase in the mobility duration at the doses of 8 and 16 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. (52.9 ± 11.2 sec. and 49.4 ± 10.5 sec.; respectively) when compared to vehicle treated group (24.0 ± 4.0 sec.).

Effects of systemic administration of escitalopram on cortical dialysate NE levels and climbing time in the FST in WT mice.

One way ANOVA on NE outflow in the FCx revealed significant effects of treatment factor ($F[2,34]=11.87$; $p < 0.001$). Escitalopram increased cortical $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ at the doses of 4 and 8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. compared to vehicle treated mice ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) (Time course Fig. 2A). The maximal increase in AUC values was $148 \pm 14\%$ of baseline at an escitalopram dose of 8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. (Fig. 2B).

In contrast, one way ANOVA revealed no effect of escitalopram on climbing behavior in the FST ($F[2,27]=3.1$; $p=0.06$) (Fig. 2C).

Effects of systemic administration of escitalopram on cortical dialysate 5-HT and NE in $\text{SERT}^{-/-}$ mice and WT littermates.

To test the hypothesis that the enhancement of NE transmission induced by escitalopram resulted from the blockade of the NET at nerve terminals, the neurochemical effects of escitalopram were studied by using intracerebral microdialysis in mice lacking the SERT ($\text{SERT}^{-/-}$ mice).

Fig. 3 compares the effects of an acute administration of escitalopram (8 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) on cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$ and

[NE]_{ext} in WT and SERT^{-/-} mice. A two-way ANOVA (treatment x genotype) on 5-HT outflow, measured from AUC calculated during a 120 min post-treatment period, revealed a significant effect of treatment (F[1,29]=76.26; p=0.001) and genotype factors (F[1,29]=55.19; p=0.001) but also a significant treatment x genotype interaction (F[1,29]=61.97; p=0.001). As expected, when the main target of the SSRIs, the SERT, was genetically inactivated, escitalopram failed to increase cortical [5-HT]_{ext} in SERT^{-/-} mice (Fig. 3A and 3C).

Similarly, a two-way ANOVA (treatment x genotype) on NE outflow indicated a significant effect of treatment (F[1,40]=30.25; p=0.001), but not of genotype (F[1,40]=0.13; p>0.05) (Fig. 3B and 3C). Escitalopram increased [NE]_{ext} in both WT and SERT^{-/-} mice (p<0.001 and p<0.001, respectively).

Since escitalopram was administered systemically in these experiments, it was not possible to determine the brain region where it exerted its neurochemical effect. To test the hypothesis that escitalopram acted preferentially at noradrenergic nerve terminals, without involving an action in the LC, its effects were studied after local perfusion of escitalopram in the FCx via reverse dialysis.

Effects of continuous local perfusion of escitalopram on cortical dialysate 5-HT and NE levels in SERT^{-/-} mice and WT littermates.

Fig. 4 compares the effects of local perfusion of escitalopram (0.5 μ M) in both WT and SERT^{-/-} mice. Under basal conditions, i.e., before treatment, 5-HT outflow in FCx of WT mice was stable. Local perfusion of escitalopram significantly increased cortical 5-HT levels in WT mice (AUC values = 569% of baseline; p<0.001), but had no significant effect on 5-HT outflow in SERT^{-/-} mice (p>0.05; Fig. 4A).

With respect to NE, local perfusion of escitalopram (0.5 μ M) significantly increased cortical NE levels in both WT and SERT^{-/-} mice (p<0.001 and p<0.001, respectively), these increases reached a maximum of approximately 163% of baseline in both genotypes (Fig. 4B). No differences were detected in [NE]_{ext} between WT and SERT^{-/-} mice after local perfusion of escitalopram (p>0.05).

Effects of pharmacological inactivation of the norepinephrine transporter on escitalopram-induced changes in cortical dialysate NE in WT mice.

Fig. 5 shows the effects of an acute administration of escitalopram (8 mg·kg⁻¹, i.p.) on cortical [NE]_{ext} in the presence of locally applied desipramine (50 μ M) in the perfusion medium in WT mice. A student-t test on AUC₀₋₁₂₀ values for NE outflow in the FCx, revealed no differences in the effects of desipramine between groups (p=0.9). Similarly analysis on AUC₁₂₀₋₂₄₀ values indicated no significant effect of escitalopram compared to vehicle treated mice (p=0.16), demonstrating that the blockade of the NET by desipramine prevented escitalopram-induced increase in cortical [NE]_{ext} in WT mice.

Effects of escitalopram on NE and 5-HT uptake mediated by low-affinity monoamine transporters in ex vivo cell extracts from WT mice.

Other categories of transporters have been shown to transport with low affinity monoaminergic neurotransmitters *in vitro*, including organic cation transporters (OCTs: Breidert *et al.*, 1998; Amphoux *et al.*, 2006; Koepsell, 2007) and Plasma Membrane monoAmine Transporter (PMAT: Engel *et al.*, 2004; Engel and Wang, 2005). Several of these transporters have been detected in various brain areas including the cortex (Vialou *et al.*, 2004; Engel *et al.*, 2004; Dahlin, 2007; Vialou *et al.*, 2008), where they could potentially contribute to escitalopram-induced increase in NE extracellular levels. One of them, OCT2, has been recently shown to participate in NE and 5-HT clearance *in vivo* in the mice brain (Bacq *et al.*, 2011). To investigate whether escitalopram could inhibit NE or 5-HT transport mediated by these low-affinity transporters, the effects of this SSRI on [³H]NE and [³H]5-HT uptake in cell suspensions from WT mice cortex were evaluated in the presence or absence of an inhibitor of low-affinity transporters, decynium 22 (D22). At the concentration used in the present study (500 μ M), D22 is a potent inhibitor of OCTs (Hayer-Zillgen *et al.*, 2002) and PMAT (Engel and Wang, 2005) with affinities within the submicromolar range. In these *ex vivo* experiments, D22 alone decreased the uptake of 5-HT (Fig. 6A) in agreement with previous *in vivo* microdialysis studies (Feng *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2010), but also that of NE (Fig. 6C). One way ANOVA revealed a significant effect of escitalopram upon D22-sensitive 5-HT uptake (F[3,10]=7.04; p<0.01; Fig. 6A and

6B), but no significant effect upon D22-sensitive NE uptake ($F[3,12]=1.08$, $p>0.05$) with an inhibition of at 1 mM and above (Fig. 6C and 6D).

DISCUSSION

Antidepressants, such as paroxetine, fluoxetine, citalopram and escitalopram used for the treatment of major depressive disorder, exert their therapeutic effects mainly by inhibiting 5-HT reuptake into presynaptic nerve terminals, thereby enhancing 5-HT neurotransmission which might be diminished in depressed patients (Invernizzi *et al.*, 1995; Sánchez *et al.*, 2003a). Although SSRIs share a common target, i.e., the SERT, the affinity, selectivity and potency to block monoaminergic transporters vary substantially. *In vitro*, the six SSRIs approved in Europe are all potent 5-HT reuptake inhibitors (Richelson and Pfenning, 1984; Sánchez and Hyttel, 1999). In agreement with this inhibitory action, intracerebral *in vivo* microdialysis studies in mice revealed that an acute systemic administration of an SSRI significantly increases cortical extracellular 5-HT levels ($[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$) (David *et al.*, 2003; Guiard *et al.*, 2004; Guilloux *et al.*, 2006; Richardson-Jones *et al.*, 2010) in a strain-dependent manner (Calcagno *et al.*, 2007). The present study extends these neurochemical observations to escitalopram by showing that in WT mice, this SSRI induced a dose-dependent increase in cortical $[5\text{-HT}]_{\text{ext}}$. In addition, consistent with a previous study (Zomkowski *et al.*, 2010), similar doses of escitalopram produced a robust antidepressant-like effect as shown here by a significant increase in swimming duration (Fig 1C). This parameter is believed to reflect the activation of the brain serotonergic system in rodents (Detke *et al.*, 1995; Renner and Lucki, 1998; Cryan and Lucki, 2000) since pretreatment with the tryptophan hydroxylase inhibitor parachlorophenylalanine, prevented SSRIs-induced increase in swimming behavior (Page *et al.*, 1999).

Considerable variations in the 5-HT/NE selectivity ratios of SSRIs have been reported *in vitro*. Based on their inhibition constants, citalopram and escitalopram emerge as the most selective compounds among the SSRIs, while fluoxetine is the least selective (Sánchez and Hyttel, 1999; Owens *et al.*, 2001). Despite this apparent selectivity for SERT, the present data indicate that the systemic or local injection of escitalopram also significantly increases $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ in the FCx of WT mice. These results are consistent with

previous *in vivo* microdialysis experiments which reveal that the acute administration of fluoxetine, paroxetine or citalopram enhances NE levels in the FCx and/or hippocampus of rodents (Jordan *et al.*, 1994; Hughes and Stanford, 1996; Shachar *et al.*, 1997; Hughes and Stanford, 1998; Millan *et al.*, 2001; Beyer *et al.*, 2002; Bymaster *et al.*, 2002; Koch *et al.*, 2002; David *et al.*, 2003; Kobayashi *et al.*, 2008). In the present study, escitalopram failed however to increase climbing behavior (Fig 2C), a parameter reflecting the activation of noradrenergic neurons arising from cells located in the lateral tegmentum as shown in rats (Cryan *et al.*, 2002) or mice (Dulawa *et al.*, 2004), as would be expected on the basis of neurochemical data. This suggests that the 50% increase in cortical $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ induced by escitalopram was not sufficient to affect this behavioral response. When comparing the relative ability of SSRIs in microdialysis studies performed in our laboratory under identical conditions, escitalopram ($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) appears, as expected, more potent to increase extracellular cortical 5-HT than citalopram and paroxetine, but surprisingly less than the SNRI venlafaxine ($8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p.) (Table 2). The fact that the most selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram also presented neurochemical noradrenergic enhancing property was particularly intriguing. Several possibilities may explain these neurochemical effects on cortical $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ in WT mice, involving direct or indirect actions at the SERT, the NET or other transporters.

Potential heterologous reuptake of NE through the SERT or the DAT

The cloning and sequencing of monoamine transporters revealed that this family shows a high degree of structural homology (Gether *et al.*, 2006). This may explain, at least in part, the fact that SSRIs, despite their selectivity, can enhance not only serotonergic but also noradrenergic neurotransmission. Vizi *et al.*, (2004) showed previously that the NE uptake was substantially reduced, but not completely abolished in the hippocampus and FCx of $\text{NET}^{-/-}$ mice. Interestingly, the neuronal component of this residual uptake was massively decreased in the presence of citalopram suggesting that NE can be taken up by serotonergic varicosities through the SERT. This heterologous uptake could explain the increase in NE outflow induced by escitalopram in the present study. However, the fact that basal cortical levels of $[\text{NE}]_{\text{ext}}$ are markedly attenuated in $\text{SERT}^{-/-}$ mice suggests that the

SERT does not contribute significantly to NE uptake in this region.

In addition since the NET and DAT cooperate, to a certain degree, in the clearance of catecholamines (i.e., DA and NE) in the prefrontal cortex (Carboni *et al.*, 1990; Moron *et al.*, 2002; Guiard *et al.*, 2008b; Borgkvist *et al.*, 2011), the possibility that escitalopram blocked the DAT thereby enhancing $[NE]_{ext}$ cannot be excluded. However, the lack of effect of escitalopram on cortical $[DA]_{ext}$ (see supplemental data 1) strongly argues against this hypothesis.

Potential action of escitalopram at low-affinity monoamine transporters

Beside the high-affinity 5-HT and NE transporters, other categories of transporters have been proposed to participate as well in the control of monoaminergic neurotransmission in the brain, such as the polyspecific organic cation transporter (OCT) family (Breidert *et al.*, 1998; Grundemann *et al.*, 1998a,b; Amphoux *et al.*, 2006; Bacq *et al.*, 2011) and Plasma Membrane monoAmine Transporter (PMAT) (Engel *et al.* 2004, Engel and Wang 2005). The affinities of these transporters *in vitro* for various monoamines, in the millimolar range, have been shown to vary depending on transporter type and species (Amphoux *et al.*, 2006). PMAT, specifically, was shown to transport 5-HT with a better efficacy than OCT3 in heterologous systems (Duan and Wang, 2010), suggesting that it could participate in 5-HT clearance. Both OCTs and PMAT have been shown to interact *in vitro*, albeit with low-affinity with antidepressants (Kekuda *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 2000, Haenisch and Bönisch, 2010). To explore whether the escitalopram mediated increase in cortical NE levels could result from an action at low-affinity monoamine transporters, we evaluated the action of this SSRI on NE and 5-HT uptake in brain cortex cell suspensions in the presence or absence of a selective inhibitor of OCTs and PMAT, D22 (Hayer-Zillgen *et al.*, 2002; Engel and Wang, 2005). In these experiments, escitalopram, even at high concentrations, had no significant action upon D22-sensitive cortical NE uptake in mice, while concentrations as high as 1 mM were needed to inhibit D22-sensitive cortical 5-HT uptake. These inhibitory concentrations are far higher than the therapeutically active concentrations of escitalopram found in brain of rodents after acute administration. Recent acute dosing studies in mice

have shown that a 30 min escitalopram pretreatment (0.3 mg·kg⁻¹, s.c.), produces a SERT occupancy of 77% and mean plasma and brain levels of approximately 15.9 and 10.6 ng·ml⁻¹ (38 and 26 nM), respectively. At the dose of 5 mg·kg⁻¹ of escitalopram, SERT occupancy reaches 99% whereas plasma and brain levels were of 247 and 401 ng·ml⁻¹ (600 and 970 nM), respectively (unpublished observations). Importantly, in rodents, steady state plasma levels have been evaluated in the range of 6-21 ng·ml⁻¹ for escitalopram (Kreilgaard *et al.*, 2008). Similarly, for citalopram, concentrations found in rodent brain after chronic treatment are 1000 fold above the inhibitory concentrations of citalopram on uptake in this *ex vivo* model (Uhr and Grauer, 2003; Cervo *et al.*, 2005; Bacq *et al.*, 2011). Taken together these data suggest that at therapeutically relevant concentrations, this SSRI does not interact directly low-affinity monoamine transporters present in the brain, OCT2, OCT3 or PMAT.

Potential effect of escitalopram on the noradrenergic system through 5-HT or blockade of the NET

The present study explored the possibility that the effects of escitalopram on NE outflow could be attributable to an excitatory effect of 5-HT on noradrenergic neurons. Close anatomical and functional interactions exist between the serotonergic and noradrenergic systems in the brain (Mongeau *et al.*, 1997; Nutt *et al.*, 2002). In particular, it is well established that the increase in 5-HT transmission induced by SSRIs inhibits NE neuronal activity (Dremencov *et al.*, 2007), an effect believed to be mediated through activation of 5-HT_{2A} and/or 5-HT_{2C} receptors expressed on γ -aminobutyric acid (GABA) neurons (Szabo and Blier 2001b; Bymaster *et al.*, 2002; Miguez *et al.*, 2011). Accordingly, in the present study, basal cortical $[5-HT]_{ext}$ were increased in knock-out SERT (SERT^{-/-}) mice, while $[NE]_{ext}$ were significantly attenuated compared to WT littermates. Thus, a putative excitatory effect of 5-HT on NE neurons would most likely involve a local action at nerve terminals. Consistent with this hypothesis, initial microdialysis studies reported that the local perfusion of the SSRIs fluoxetine or citalopram can enhance cortical $[NE]_{ext}$ (Hughes and Stanford, 1996; Hughes and Stanford, 1998). Interestingly, increases in the synaptic availability of 5-HT in the hippocampus have also been shown to activate the noradrenergic transmission through 5-HT_{1A} (Hajós-Korcsok *et al.*, 1999) and/or 5-HT₃ receptors (Mongeau *et al.*, 1994).

To clarify this point, we hypothesized that if the escitalopram-induced increase in cortical $[NE]_{ext}$ was due to its local action at 5-HT terminals, it should be blunted in mice lacking the SERT, which display no detectable 5-HT reuptake in the FCx (Perez *et al.*, 2006). As expected, escitalopram did not increase cortical $[5-HT]_{ext}$ in our experiments with SERT^{-/-} mice. However, the ability of the systemic administration or local perfusion of escitalopram to increase cortical $[NE]_{ext}$ remained unchanged in SERT^{-/-} as compared to WT mice (164% vs 148% and 162% vs 163%, respectively) indicating that elevation of 5-HT was not required to stimulate cortical NE release. These data strongly suggest that escitalopram can increase cortical $[NE]_{ext}$ by a SERT-independent mechanism, involving a potentially direct inhibition of NET.

To further explore this possibility, we anticipated that if the escitalopram-induced an increase in cortical $[NE]_{ext}$ resulted from the blockade of NET, it would be blunted if this transporter have been previously inactivated. We thus evaluated the effect of escitalopram on cortical $[NE]_{ext}$ in the presence of locally applied desipramine, at a concentration (50 μ M) that inhibits only NE reuptake in the frontal cortex (supplemental data 2A and 2B). Importantly, with respect to the occupancy of the NET, we can legitimately consider that 50 μ M of desipramine optimally inactivated this transporter, since higher concentrations (100 μ M) failed to enhance further $[NE]_{ext}$ (supplemental data 2B). As previously described in anaesthetized mice (Fisher *et al.*, 2007), our results show that desipramine alone increased cortical $[NE]_{ext}$ in awake WT mice. In these conditions, escitalopram, when administered i.p. 2 hours after the beginning of the intra-cortical desipramine perfusion, failed to enhance further cortical $[NE]_{ext}$. These findings further strengthen the possibility that escitalopram can inhibit the NET.

In conclusion, the present study suggests that *in vivo*, escitalopram is not as selective for transporters as it was reported *in vitro*, and is likely to interact with the NET locally in the FCx. The increased NE efflux in the FCx appears to play a minor role in the antidepressant-like activity of escitalopram administered acutely, since climbing activity in the FST did not change in WT mice. On the other hand, it is possible that escitalopram increases dialysate NE levels also in other brain regions more directly involved in its behavioral activity (the hippocampus, amygdala), than the one studied here. These effects of

escitalopram on cortical $[NE]_{ext}$ are probably dependent on the doses administered in mice. It is likely that the exposures produced by the doses used in the present study exceed those that will be achieved in clinical use. It will thus be interesting in future investigations to complete the present study by evaluating the antidepressant-like activity of escitalopram in rodents, and explore the neurochemical and behavioral consequences of a repeated administration.

Acknowledgements

This study was supported by H. Lundbeck A/S. The Department of Neuropharmacology is an "Equipe d'accueil" (EA 3544) from the 'Ministère de la Jeunesse, de l'Éducation Nationale et de la Recherche' (MJENR-France). A.B. is a recipient of a fellowship from the French Ministry for Research. This work has been supported by the technical assistance of Valerie Dupont-Domergue and all her staff from the animal care facility of the Institut Federatif de recherche-IFR141 of the Paris XI University. We thank Dr I. Seif for providing the SERT knock-out mice used in this study.

Conflict of interest: None

REFERENCE

- Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüss M, Mannoury La Cour C, Rochat C, et al., (2006). Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology*. **50**(8):941-52.
- Bacq A, Balasse L, Biala G, Guiard B, Gardier AM, Schinkel A, et al. (2011). Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/mp.2011.87
- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, et al. (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* **53**(4): 649-655.
- Bert L, Favale D, Jégo G, Greve P, Guilloux JP, Guiard BP, et al. (2004). Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. *J*

- Neurosci Methods* **140**(1-2): 53-57.
- Berton O, Nestler EJ (2006). New approaches to antidepressant drug discovery: beyond monoamines. *Nat Rev Neurosci* **7**(2): 137-151.
- Beyer CE, Boikess S, Luo B, Dawson LA (2002). Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol* **16**(4): 297-304.
- Breidert T, Spitzenberger F, Gründemann D, Schömig E (1998). Catecholamine transport by the organic cation transporter type 1 (OCT1). *Br J Pharmacol*. **125**(1):218-24.
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, Phebus L, et al. (2002). Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* **160**(4): 353-361.
- Calcagno E, Canetta A, Guzzetti S, Cervo L, Invernizzi RW (2007). Strain differences in basal and post-citalopram extracellular 5-HT in the mouse medial prefrontal cortex and dorsal hippocampus: relation with tryptophan hydroxylase-2 activity. *J Neurochem* **103**(3): 1111-1120.
- Ceglia I, Acconcia S, Fracasso C, Colovic M, Caccia S, Invernizzi RW (2004). Effects of chronic treatment with escitalopram or citalopram on extracellular 5-HT in the prefrontal cortex of rats: role of 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol* **142**(3): 469-478.
- Cervo L, Canetta A, Calcagno E, Burbassi S, Sacchetti G, Caccia S, et al. (2005). Genotype-dependent activity of tryptophan hydroxylase-2 determines the response to citalopram in a mouse model of depression. *J Neurosci* **25**(36): 8165-8172.
- Cryan JF, Page ME, Lucki I (2002). Noradrenergic lesions differentially alter the antidepressant-like effects of reboxetine in a modified forced swim test. *Eur J Pharmacol* **436**(3): 197-205.
- Cryan JF, Lucki I (2000). Antidepressant-like behavioral effects mediated by 5-Hydroxytryptamine(2C) receptors. *J Pharmacol Exp Ther* **295**(3): 1120-1126.
- Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J (2007). Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience*. **146**(3):1193-211.
- David DJ, Bourin M, Jegou G, Przybylski C, Jolliet P, Gardier AM (2003). Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br J Pharmacol* **140**(6): 1128-1136.
- Detke MJ, Rickels M, Lucki I (1995). Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)* **121**(1): 66-72.
- Dremencov E, El Mansari M, Blier P (2007). Noradrenergic augmentation of escitalopram response by risperidone: electrophysiologic studies in the rat brain. *Biol Psychiatry* **61**(5): 671-678.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* **29**(7): 1321-1330.
- Duan H, Wang J (2010). Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther*. **335**(3):743-53.
- El Mansari M, Sanchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology* **30**(7): 1269-1277.
- Engel K, Zhou M, Wang J (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*. **279**(48):50042-9.
- Engel K, Wang J (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol*. **68**(5):1397-407.
- Feng N, Lowry CA, Lukkes JL, Orchinik M, Forster GL, Renner KJ (2010). Organic cation transporter inhibition increases medial hypothalamic serotonin under basal conditions and during mild restraint. *Brain Res*. **1326**:105-13.
- Feng N, Mo B, Johnson PL, Orchinik M, Lowry CA, Renner KJ (2005). Local inhibition of organic cation transporters increases extracellular serotonin in the medial hypothalamus. *Brain Res*. **1063**(1):69-76.
- Fisher AS, Stewart RJ, Yan T, Hunt SP, Stanford SC (2007). Disruption of noradrenergic transmission and behavioural response to a novel environment NK1R-/- mice *European Journal of Neuroscience* **28**(4):1195-1204.

- Frazer A (2001). Serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors: prediction of clinical effects from in vitro potencies. *J Clin Psychiatry* **62 Suppl 12**: 16-23.
- Garnock-Jones KP, McCormack PL (2010). Escitalopram: a review of its use in the management of major depressive disorder in adults. *CNS Drugs* **24**(9): 769-796.
- Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A (2006). Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* **27**(7): 375-383.
- Grundemann D, Koster S, Kiefer N, Breidert T, Engelhardt M, Spitzenberger F, *et al.* (1998a). Transport of monoamine transmitters by the organic cation transporter type 2, OCT2. *J Biol Chem* **273**(47): 30915-30920.
- Grundemann D, Schechinger B, Rappold GA, Schomig E (1998b). Molecular identification of the corticosterone-sensitive extraneuronal catecholamine transporter. *Nat Neurosci* **1**(5): 349-351.
- Guiard BP, El Mansari M, Merali Z, Blier P (2008a). Functional interactions between dopamine, serotonin and norepinephrine neurons: an in-vivo electrophysiological study in rats with monoaminergic lesions. *Int J Neuropsychopharmacol.* **11**(5):625-39.
- Guiard BP, El Mansari M, Blier P (2008b). Cross-talk between dopaminergic and noradrenergic systems in the rat ventral tegmental area, locus ceruleus, and dorsal hippocampus. *Mol Pharmacol* **74**(5): 1463-1475.
- Guiard BP, Przybylski C, Guilloux JP, Seif I, Froger N, De Felipe C, *et al.* (2004). Blockade of substance P (neurokinin 1) receptors enhances extracellular serotonin when combined with a selective serotonin reuptake inhibitor: an in vivo microdialysis study in mice. *J Neurochem* **89**(1): 54-63.
- Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Reperant C, Toth M, *et al.* (2006). Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **31**(10): 2162-2172.
- Haenisch B, Bönisch H (2010). Interaction of the human plasma membrane monoamine transporter (hPMAT) with antidepressants and antipsychotics. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* **381**(1):33-9.
- Hajos-Korcsok E, McQuade R, Sharp T (1999). Influence of 5-HT_{1A} receptors on central noradrenergic activity: microdialysis studies using (+/-)-MDL 73005EF and its enantiomers. *Neuropharmacology* **38**(2): 299-306.
- Hayer-Zillgen M, Brüss M, Bönisch H (2002). Expression and pharmacological profile of the human organic cation transporters hOCT1, hOCT2 and hOCT3. *Br J Pharmacol.* **136**(6):829-36.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR (2000). *Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains with CD ROM.* Elsevier: San Diego, CA.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* **33**(2): 406-417.
- Hughes ZA, Stanford SC (1996). Increased noradrenaline efflux induced by local infusion of fluoxetine in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* **317**(1): 83-90.
- Hughes ZA, Stanford SC (1998). Evidence from microdialysis and synaptosomal studies of rat cortex for noradrenaline uptake sites with different sensitivities to SSRIs. *Br J Pharmacol* **124**(6): 1141-1148.
- Invernizzi R, Bramante M, Samanin R (1995). Extracellular concentrations of serotonin in the dorsal hippocampus after acute and chronic treatment with citalopram. *Brain Res* **696**(1-2): 62-66.
- Jacquot C, David DJ, Gardier AM, Sanchez C (2007). [Escitalopram and citalopram: the unexpected role of the R-enantiomer]. *Encephale* **33**(2): 179-187.
- Jordan S, Kramer GL, Zukas PK, Moeller M, Petty F (1994). In vivo biogenic amine efflux in medial prefrontal cortex with imipramine, fluoxetine, and fluvoxamine. *Synapse* **18**(4): 294-297.
- Kekuda R, Prasad PD, Wu X, Wang H, Fei YJ, Leibach FH, Ganapathy V (1998). Cloning and functional characterization of a potential-sensitive, polyspecific organic cation transporter (OCT3) most abundantly expressed in placenta. *J Biol Chem.* **273**(26):15971-9.
- Kennedy SH, Andersen HF, Thase ME (2009). Escitalopram in the treatment of major depressive disorder: a meta-analysis. *Curr Med Res Opin* **25**(1): 161-175.
- Kobayashi K, Ikeda Y, Haneda E, Suzuki H (2008). Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci* **28**(24): 6272-6280.
- Koch S, Perry KW, Nelson DL, Conway RG, Threlkeld PG, Bymaster FP (2002). R-fluoxetine increases extracellular

- DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* **27**(6): 949-959.
- Koepsell H, Lips K, Volk C (2007). Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications. *Pharm Res* **24**(7): 1227-1251.
- Kornstein SG, Li D, Mao Y, Larsson S, Andersen HF, Papakostas GI (2009). Escitalopram versus SNRI antidepressants in the acute treatment of major depressive disorder: integrative analysis of four double-blind, randomized clinical trials. *CNS Spectr* **14**(6): 326-333.
- Kreilgaard M, Smith DG, Brennum LT, Sanchez C (2008). Prediction of clinical response based on pharmacokinetic/pharmacodynamic models of 5-hydroxytryptamine reuptake inhibitors in mice. *Br J Pharmacol* **155**(2): 276-284.
- Migueluez C, Fernandez-Aedo I, Torrecilla M, Grandoso L, Ugedo L (2009). $\alpha(2)$ -Adrenoceptors mediate the acute inhibitory effect of fluoxetine on locus coeruleus noradrenergic neurons. *Neuropharmacology* **56**(6-7): 1068-1073.
- Migueluez C, Grandoso L, Ugedo L (2011). Locus coeruleus and dorsal raphe neuron activity and response to acute antidepressant administration in a rat model of Parkinson's disease. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**(2): 187-200.
- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Rivet JM, Auclair A, et al. (2001). S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: I. Receptor binding, electrophysiological, and neurochemical profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J Pharmacol Exp Ther* **298**(2): 565-580.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C (1997). The serotonergic and noradrenergic systems of the hippocampus: their interactions and the effects of antidepressant treatments. *Brain Res Brain Res Rev* **23**(3): 145-195.
- Mongeau R, De Montigny C, Blier P (1994). Effect of long-term administration of antidepressant drugs on the 5-HT₃ receptors that enhance the electrically evoked release of [3H]noradrenaline in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* **271**(1): 121-129.
- Mork A, Kreilgaard M, Sanchez C (2003). The R-enantiomer of citalopram counteracts escitalopram-induced increase in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats. *Neuropharmacology* **45**(2): 167-173.
- Nutt DJ (2002). The neuropharmacology of serotonin and noradrenaline in depression. *Int Clin Psychopharmacol* **17 Suppl 1**: S1-12.
- Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB (2001). Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol Psychiatry* **50**(5): 345-350.
- Page ME, Detke MJ, Dalvi A, Kirby LG, Lucki I (1999). Serotonergic mediation of the effects of fluoxetine, but not desipramine, in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* **147**(2): 162-167.
- Perez XA, Bianco LE, Andrews AM (2006). Filtration disrupts synaptosomes during radiochemical analysis of serotonin uptake: comparison with chronoamperometry in SERT knockout mice. *J Neurosci Methods* **154**(1-2): 245-255.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* **266**(5604): 730-732.
- Pudovkina OL, Cremers TI, Westerink BH (2002). The interaction between the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus studied with dual-probe microdialysis. *Eur J Pharmacol* **445**(1-2): 37-42.
- Reneric JP, Lucki I (1998). Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)* **136**(2): 190-197.
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, Kung HF, et al. (2010). 5-HT_{1A} autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron* **65**(1): 40-52.
- Richelson E, Pfenning M (1984). Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol* **104**(3-4):277-86.
- Sanchez C, Bergqvist PB, Brennum LT, Gupta S, Hogg S, Larsen A, et al. (2003a). Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. *Psychopharmacology (Berl)* **167**(4): 353-362.

- Sanchez C, Gruca P, Papp M (2003b). R-citalopram counteracts the antidepressant-like effect of escitalopram in a rat chronic mild stress model. *Behav Pharmacol* **14**(5-6): 465-470.
- Sanchez C, Hyttel J (1999). Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cell Mol Neurobiol* **19**(4): 467-489.
- Shachar D, Klein E, Tabak A, Finberg JP (1997). Effect of single and repeated administration of fluvoxamine on noradrenaline release in rat brain. *Eur J Pharmacol* **332**(3): 237-243.
- Szabo ST, Blier P (2001a). Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res* **922**(1): 9-20.
- Szabo ST, Blier P (2001b). Serotonin (1A) receptor ligands act on norepinephrine neuron firing through excitatory amino acid and GABA(A) receptors: a microiontophoretic study in the rat locus coeruleus. *Synapse* **42**(4): 203-212.
- Uhr M, Grauer MT (2003). abcb1ab P-glycoprotein is involved in the uptake of citalopram and trimipramine into the brain of mice. *J Psychiatr Res* **37**(3): 179-185. (11): 793-801.
- Vialou V, Amphoux A, Zwart R, Giros B, Gautron S (2004). Organic cation transporter 3 (Slc22a3) is implicated in salt-intake regulation. *J Neurosci* **24**(11):2846-51.
- Vialou V, Balasse L, Callebort J, Launay JM, Giros B, Gautron S (2008). Altered aminergic neurotransmission in the brain of organic cation transporter 3-deficient mice. *J Neurochem* **106**(3):1471-82.
- Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP (2004). Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* **24**(36): 7888-7894.
- Wu X, Huang W, Ganapathy ME, Wang H, Kekuda R, Conway SJ, Leibach FH, Ganapathy V (2000). Structure, function, and regional distribution of the organic cation transporter OCT3 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**(3):F449-58.
- Zomkowski AD, Engel D, Gabilan NH, Rodrigues AL (2010). Involvement of NMDA receptors and l-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effects of escitalopram in the forced swimming test. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**

TABLES

TABLE 1: Basal extracellular 5-HT and NE levels in the frontal cortex of wild-type (WT) and SERT^{-/-} mice.*: significantly different from WT mice.**

Basal/Mice	WT	SERT ^{-/-}
5-HT	2.16 ± 0.19 (n = 32)	13.29 ± 3.02*** (n = 16)
NE	6.77 ± 0.57 (n = 35)	3.08 ± 0.78*** (n = 16)

TABLE 2: *In vivo* selectivity of antidepressant drugs in mice measured by intracerebral microdialysis.

Ratio of AUC values in WT mice	Escitalopram 8 mg·kg ⁻¹ i.p.	Citalopram 8 mg·kg ⁻¹ i.p.	Paroxetine 8 mg·kg ⁻¹ i.p.	Venlafaxine 8 mg·kg ⁻¹ i.p.
	<i>Present study</i>	<i>David et al. 2003</i>		
5-HT/NE	2.03	1.68	0.91	2.91

FIGURES

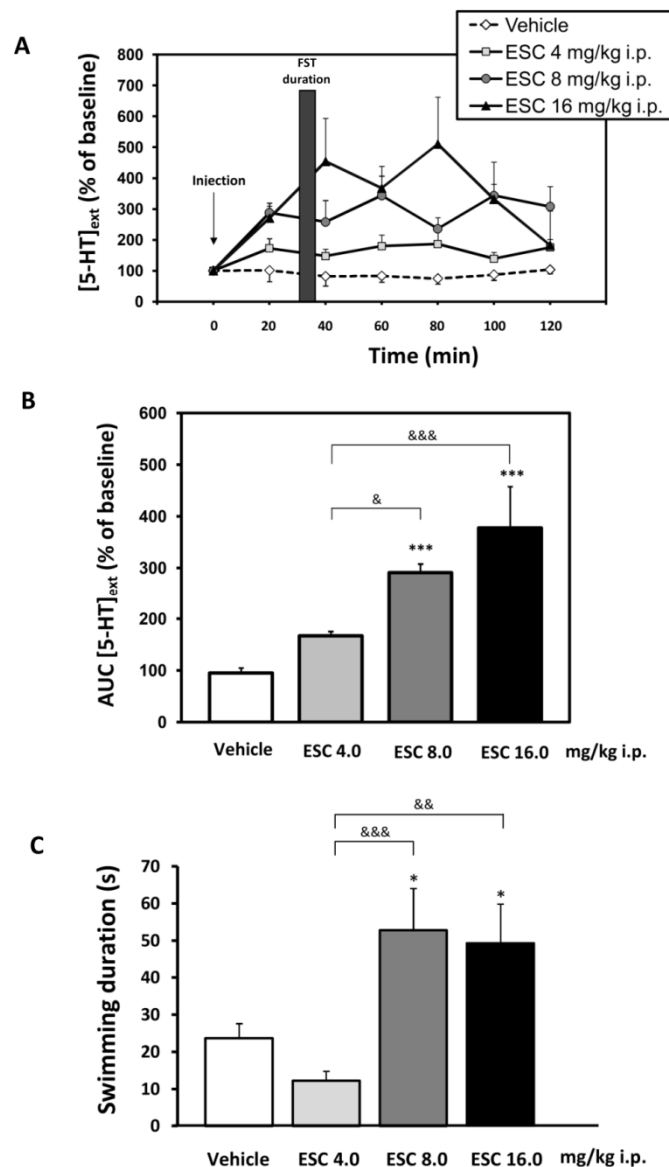


FIGURE 1: Effects of acute escitalopram administration on extracellular 5-HT levels in the frontal cortex and on swimming behavior in the forced swimming test (FST) in wild-type mice. Mice received either vehicle or escitalopram (4, 8, 16 mg·kg⁻¹; i.p.). **A.** Time course. Data are means ± S.E.M. Values of [5-HT]_{ext} in the frontal cortex (FCx) are expressed as percentages of baseline (B₀) following exposure to vehicle or escitalopram (n=7–8 mice per group). Baseline 5-HT in vehicle, escitalopram 4, 8 and 16 mg·kg⁻¹; i.p. were 2.65 ± 0.21, 2.21 ± 0.18, 2.11 ± 0.09 and 1.6 ± 0.29 fmol/20 µl; respectively. The grey area indicates the duration time of the FST (i.e., 6 min). Microdialysis and behavioral experiments were carried out with the same administration protocol and the swimming parameter in the FST was measured, in a separated group of mice, at the maximum effect of escitalopram 8 mg·kg⁻¹. **B.** AUC values (means ± S.E.M.) were calculated for the amount of 5-HT outflow collected during 0-120 min post-treatment for escitalopram. **C.** Antidepressant-like effect of the escitalopram on the swimming time in the FST in wild-type mice (n=9-10 mice per group). *P<0.05; ***P<0.001: significantly different from vehicle-injected mice. & P<0.05; && P<0.01; &&& P<0.001 compared to the escitalopram (8; 16 mg·kg⁻¹ i.p.) group and escitalopram 4 mg·kg⁻¹ i.p. (one-way ANOVA, Fisher's PLSD *post-hoc* test).

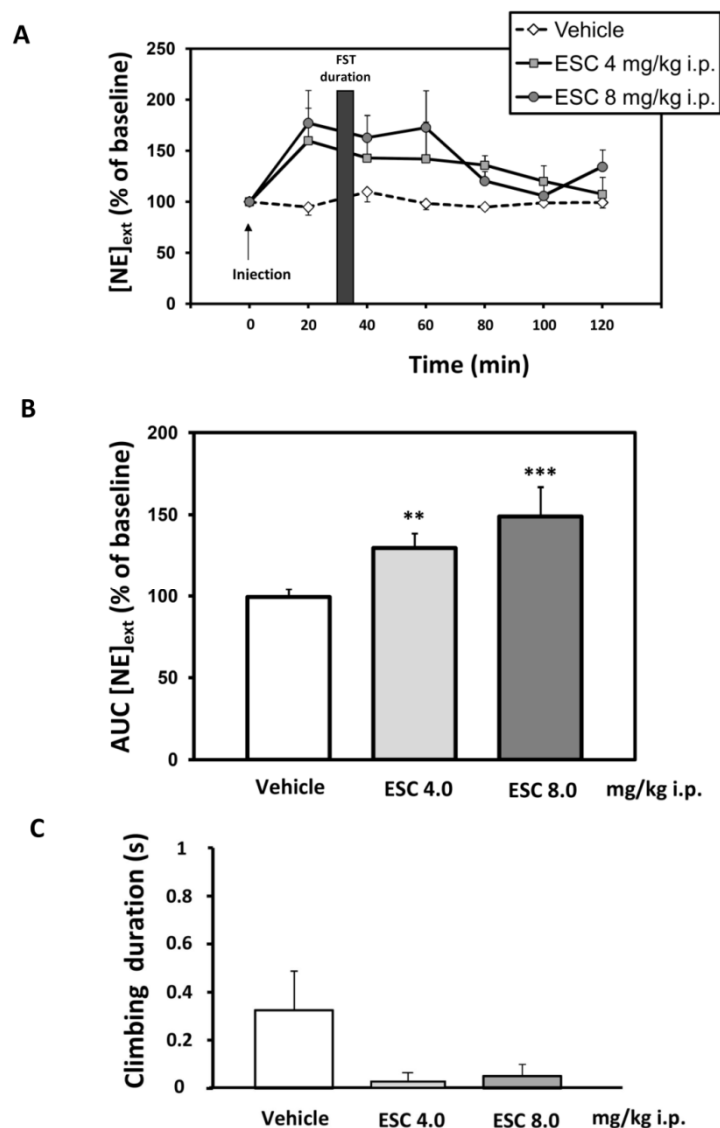


FIGURE 2: Effects of acute escitalopram administration on extracellular NE levels in the frontal cortex and on the climbing time in wild-type mice in the forced swimming test (FST) in wild-type mice. Mice received either the vehicle or escitalopram (4 and 8 mg·kg⁻¹ i.p.). **A.** Time course. Data are means ± S.E.M. values of [NE]_{ext} in the frontal cortex (FCx) expressed as percentages of baseline (B₀) following exposure to vehicle or escitalopram (n=7–8 mice per group). Baseline NE in vehicle, escitalopram 4 and 8 mg·kg⁻¹; i.p. were 6.23 ± 0.29, 8.01 ± 0.91 and 6.01 ± 0.76 fmol/20 µl; respectively. The grey area indicates the duration time of the FST (i.e., 6 min). Microdialysis and behavioral experiments were carried out with the same protocol and the climbing parameter in the FST was measured, in a separated group of mice, at the maximum effect of escitalopram 8 mg·kg⁻¹. **B.** AUC values (means ± S.E.M.) were calculated for the amount of NE outflow collected during 0–120 min post-treatment for escitalopram. **C.** Antidepressant-like effect of escitalopram on climbing time in the FST in wild-type mice (n=9–10 mice per group). ** P<0.01; *** P<0.001: significantly different from vehicle-injected mice (one-way ANOVA, Fisher's PLSD *post-hoc* test).

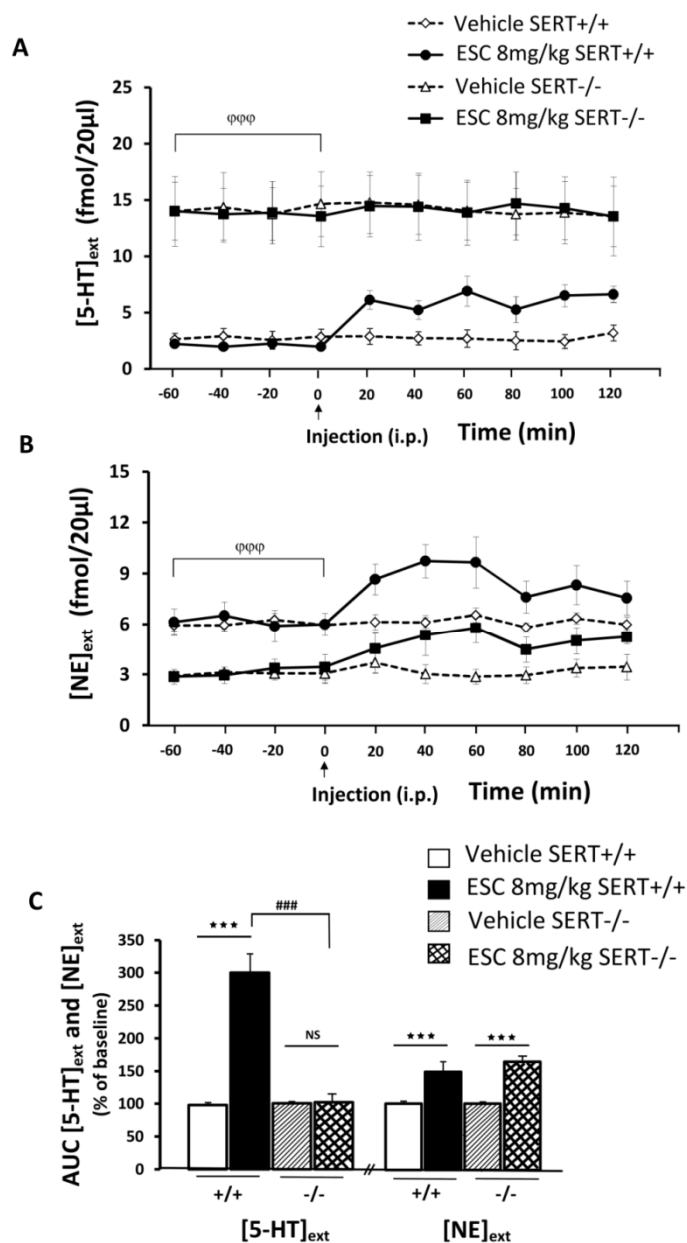


FIGURE 3: Effect of systemic administration of escitalopram on extracellular levels of 5-HT and NE in the frontal cortex in wild-type and SERT^{-/-} mice. A,B. Time course. Data are means ± S.E.M. values of [5-HT]_{ext} and [NE]_{ext} expressed as percentages of baseline (B₀) following exposure to vehicle or escitalopram (n=5–7 mice per group). Arrow indicates the time at which the injection of either vehicle in WT (◇) or SERT^{-/-} mice (△), or escitalopram 8 mg·kg⁻¹, i.p. in WT (●) or SERT^{-/-} mice (■) was performed. Baseline 5-HT were 2.65 ± 0.21 and 2.11 ± 0.09 fmol/20 μl in WT mice administered vehicle and escitalopram 8 mg·kg⁻¹, i.p.; respectively and 13.01 ± 3.28 and 13.69 ± 2.04 fmol/20 μl in SERT^{-/-} mice. Baseline NE were 6.35 ± 0.81 and 6.62 ± 1.13 fmol/20 μl in WT mice administered vehicle and escitalopram 8 mg·kg⁻¹, i.p.; respectively and 2.93 ± 0.87 and 3.15 ± 0.97 fmol/20 μl in SERT^{-/-} mice. **C.** AUC values (means ± S.E.M.) were calculated for the amount of 5-HT and NE outflow collected during 0–120 min post-treatment for ESC. ***p<0.001: significantly different between controls and escitalopram- treated mice. &&&p<0.001: significantly different from SERT^{-/-} mice.

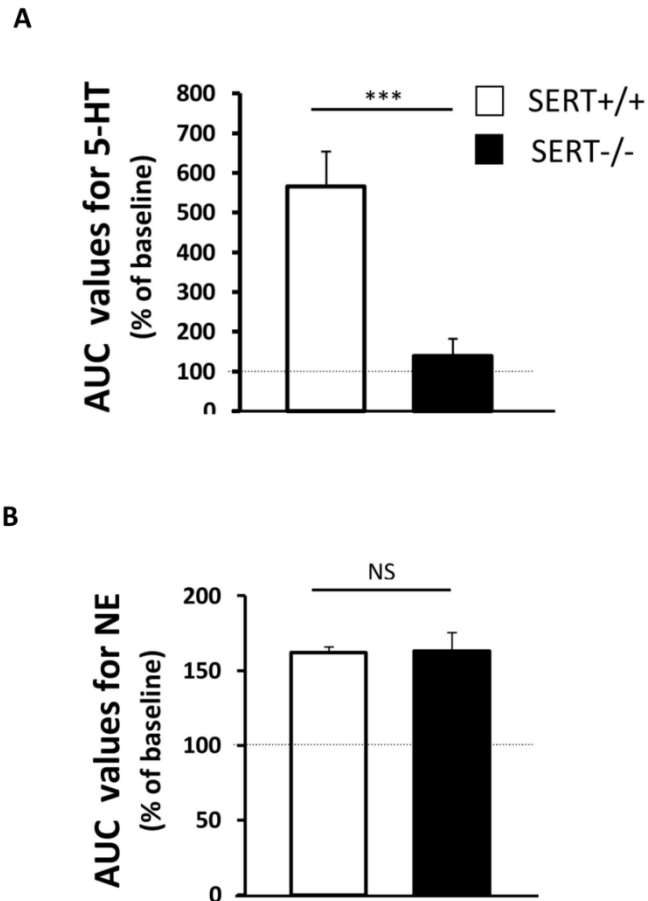
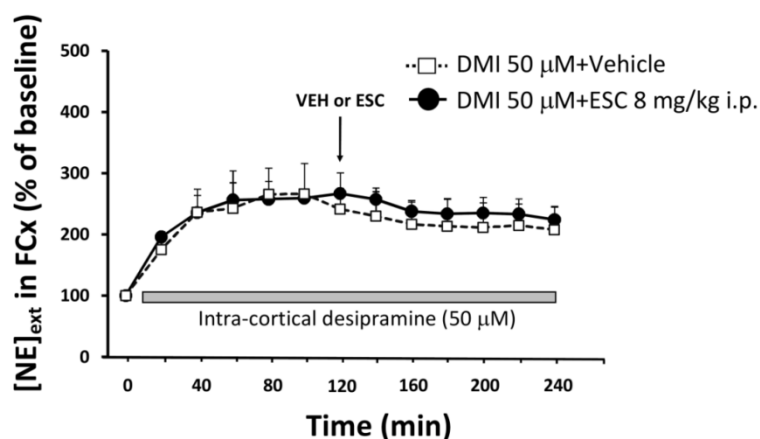


FIGURE 4: Effect of local perfusion of escitalopram on extracellular levels of 5-HT and NE in the frontal cortex in wild-type and SERT^{-/-} mice. A. AUC values (mean $\pm$ S.E.M.) were calculated for the amount of 5-HT outflow collected during the cortical 120 min perfusion of escitalopram 0.5 μ M (n=4–6 mice per group). ***P<0.001: significantly different from SERT^{+/+} mice in the same drug condition. **B.** AUC values (mean $\pm$ S.E.M.) were calculated for the amount of NE outflow collected during the cortical 120 min perfusion of escitalopram 0.5 μ M (n=4–6 mice per group). NS: not statistically significant. SERT: serotonin transporter.

A



B

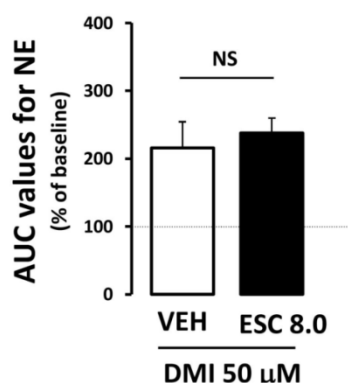


FIGURE 5: Effects of pharmacological inactivation of the norepinephrine transporter on escitalopram-induced changes in cortical dialysate NE levels in WT mice. A. Time course. Data are means $\pm$ S.E.M. values of $[NE]_{ext}$ expressed as percentages of baseline (B_0) following exposure to vehicle or escitalopram ($n=5-7$ mice per group). Arrow indicates the time at which the injection of vehicle ($\square$) or escitalopram $8\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, i.p. ($\circ$) was performed. Grey bar represent the local perfusion of desipramine (DMI, $50\text{ }\mu\text{M}$) into the frontal cortex (FCX) **B.** AUC values (means $\pm$ S.E.M.) were calculated for the amount of NE outflow collected during 120–240 min post-injection. NS: not statistically significant.

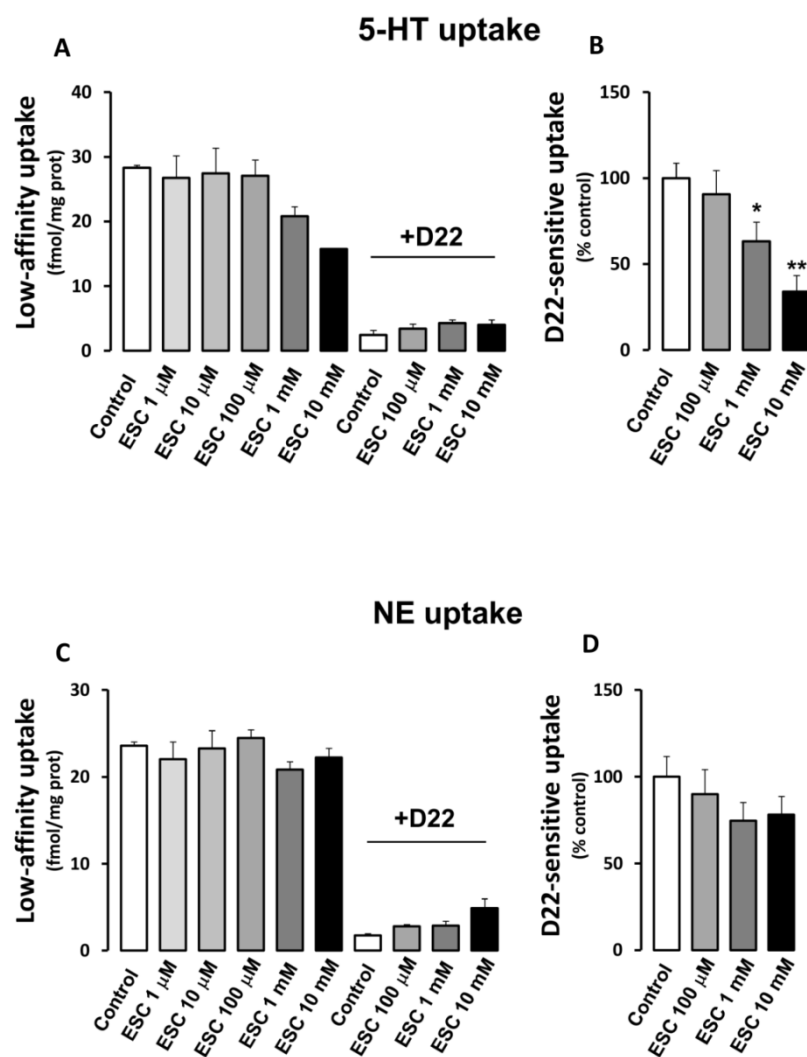


FIGURE 6: Effects of escitalopram on ex vivo NE and 5-HT uptake by low-affinity transporter in the frontal cortex in WT mice. **A-C.** Representative [3 H] NE and 5-HT uptake in cortex extracts in the presence of increasing concentrations of escitalopram (1 μ M to 10 mM) with or without the inhibitor D22 is expressed as means fmol $\pm$ S.E.M. normalised by protein concentration (n= 3-5 experiments). **B-D.** D22-sensitive [3 H] NE and 5-HT uptake in the presence of increasing concentrations of escitalopram (100 μ M to 10 mM) is expressed as percentage of D22-sensitive uptake in absence of citalopram (Control; n = 3-5). D22-sensitive uptake rates were defined by subtracting uptake in the presence of D22 from the uptake observed in its absence * P<0.05; ** P<0.01: significantly different from control (one-way ANOVA one-way followed by Fischer *post-hoc* test).

SUPPLEMENTARY DATA

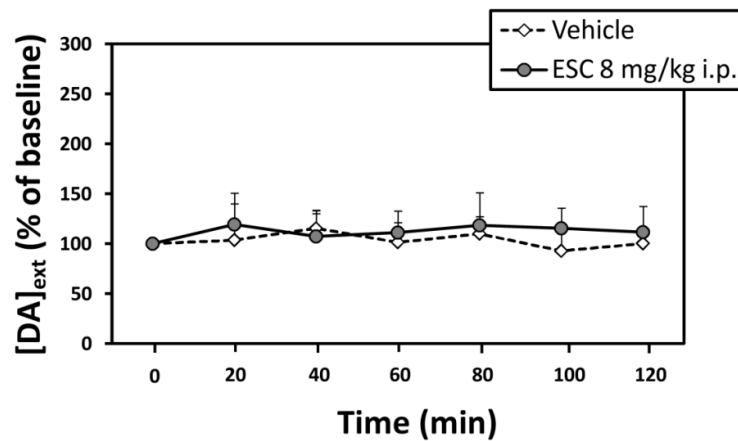
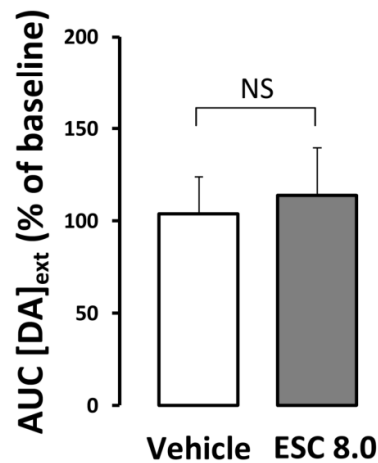
Materials and methods

Microdialysis procedure

Supplemental microdialysis experiments were conducted according to the procedure detailed in the main manuscript.

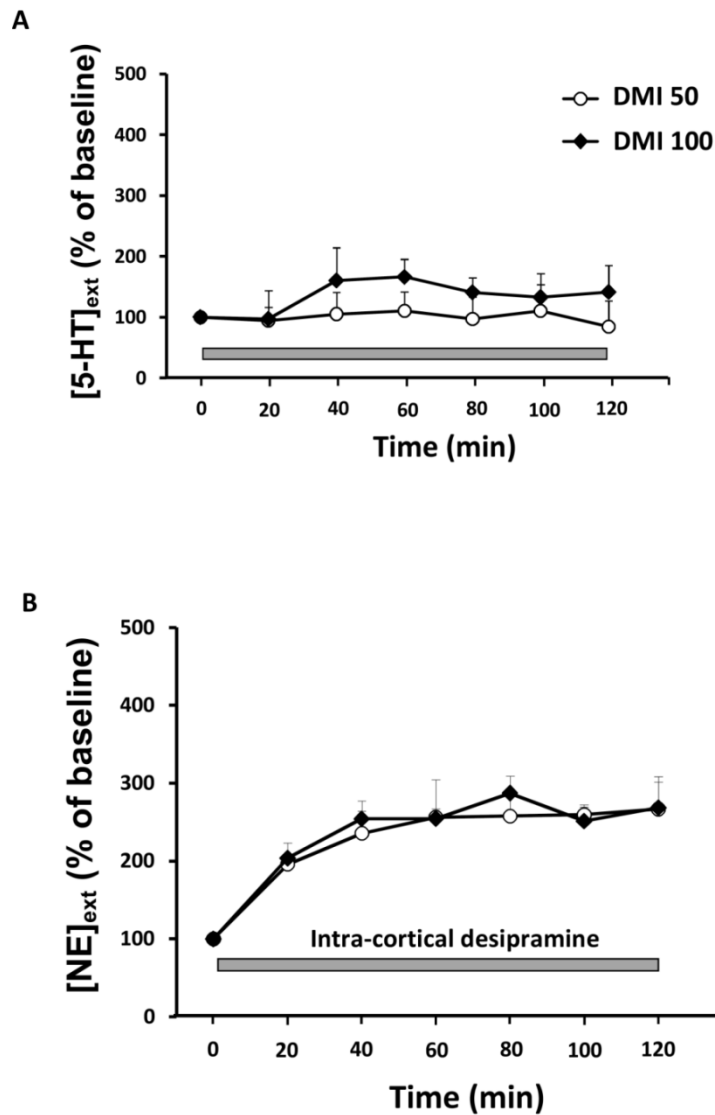
To determine the effect of systemic administration of escitalopram (8 mg.kg⁻¹; i.p.) on cortical extracellular levels of dopamine, one hour after the start of aCSF perfusion (stabilization period), four fractions were collected (one every 20 min) to measure the basal values (mean $\pm$ S.E.M. corresponding to B0 at t0) calculated for each mouse before administration of escitalopram. Dialysate samples were then collected for a 0-120 posttreatment period and analyzed for DA by a high-performance liquid chromatography (HPLC) system (XL-ODS, 4.6 x 75 mm, particle size 3 μ m; Beckman) coupled to an amperometric detector (1049 A, Hewlett-Packard, Les Ulis, France). The mobile phase was the same than that described for 5-HT. The limit of sensitivity for DA was $\approx$ 0.5 fmol/sample (signal-tonoise ratio=2).

To determine the effect of local perfusion of desipramine (50 and 100 μ M) on cortical extracellular levels of norepinephrine, one hour after the start of aCSF perfusion (stabilization period), four fractions were collected (one every 20 min) to measure the basal values (mean $\pm$ S.E.M. corresponding to B0 at t0) calculated for each mouse before local perfusion of vehicle or desipramine. Dialysate samples were then collected for a 0-120 post-treatment period and analyzed for NE by a high-performance liquid chromatography (HPLC) as described.

A**B****C**

Bo	VEH	ESC 8
DA	0.46 ± 0.11	0.68 ± 0.20

Supplemental data 1: Effects of acute escitalopram administration on extracellular DA levels in the frontal cortex in wild-type mice. Mice received either vehicle or escitalopram (8 mg.kg⁻¹; i.p.). **A.** Time course. Data are means ± S.E.M. Values of [DA]_{ext} in the frontal cortex (FCx) are expressed as percentages of baseline (B0) following exposure to vehicle or escitalopram (n=7–8 mice per group). Baseline DA in vehicle and escitalopram 8 mg.kg⁻¹; i.p. were 0.46 ± 0.11 and 0.68 ± 0.21 fmol/20 µl; respectively. **B.** AUC values (means ± S.E.M.) were calculated for the amount of DA outflow collected during 0-120 min post-treatment for escitalopram. **C.** Basal extracellular DA level in the frontal cortex of wild-type mice.



Supplemental data 2: Effects of intra-cortical perfusion of desipramine on extracellular 5-HT and NE levels in wild-type mice. Mice received an intra-cortical perfusion of desipramine (50 and 100 μ M) **A, B.** Time course. Data are means $\pm$ S.E.M. Values of [5-HT]_{ext} (A) or of [NE]_{ext} (B) in the frontal cortex (FCx) are expressed as percentages of baseline (B0) perfusion of desipramine (n=4–5 mice per group). The grey area indicates the duration of desipramine perfusion by reverse dialysis

DISCUSSION GENEGALE

DISCUSSION

Il est clairement établi que le système sérotoninergique central est soumis à un fort rétrocontrôle inhibiteur exercé par les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} (Gardier et al., 1996). Ces freins biologiques sont principalement mobilisés lors d'une augmentation des concentrations extracellulaires de sérotonine (5-HT) endogène. Ainsi, le blocage de la recapture de la 5-HT par les antidépresseurs appartenant à la classe des Inhibiteurs Sélectifs de Recapture de la Sérotonine (ISRS), entraîne des effets neurochimiques modérés en raison de la présence de ces autorécepteurs (Gardier et al., 1996). Différentes études pharmacologiques et génétiques sont venues étayer cette hypothèse. Par exemple, le blocage des récepteurs 5-HT_{1A} par un antagoniste comme le WAY100635 ou le pindolol, prévient ou inverse l'effet inhibiteur de l'administration aiguë des ISRS sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques (Romero et al., 1996 ; Blier et al., 1998 ; El Mansari et al., 2005 ; Castro et al., 2008). Ces antagonistes sont également capables de potentialiser l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans les régions terminales, telles que le cortex frontal ou l'hippocampe, induite par un ISRS (Gobert et al., 1997 ; Hjorth et al., 1997 ; Gartside et al., 1999 ; Gobert et Millan, 1999 ; Dawson et Nguyen, 2000 ; Guilloux et al., 2006). Les souris mutantes ont permis de confirmer le rôle majeur du récepteur 5-HT_{1A} dans le mécanisme d'action des ISRS puisque les effets neurochimiques de ces antidépresseurs sont renforcés chez des souris Knock-Out, privées de manière constitutive du récepteur 5-HT_{1A} (Bortolozzi et al., 2004 ; Guilloux et al., 2006). Concernant l'autorécepteur 5-HT_{1B}, des résultats similaires ont été rapportés à la fois à l'aide d'approches pharmacologique (avec un antagoniste sélectif, le GR127935 ; Gobert et al., 1997 ; Gobert et Millan, 1999) ou génétique (avec les souris KO pour le récepteur 5-HT_{1B} ; Trillat et al., 1997 ; Malagié et al., 2001 ; Malagié et al., 2002 ; Gardier et al., 2003) (**Figure 25**).

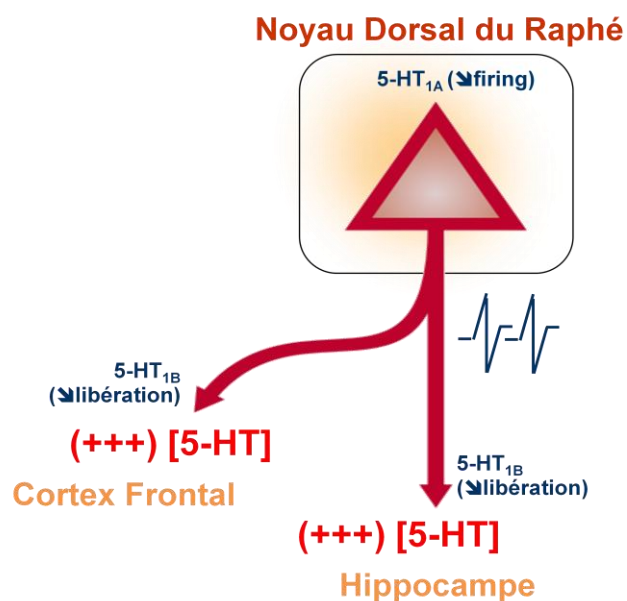


Figure 25: Contrôle de l'activité des neurones sérotoninergiques par les auto-récepteurs inhibiteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B}

Au cours de ce travail de thèse, nous avons étudié les réponses électrophysiologiques et neurochimiques des ISRS chez des souris mutantes privées de manière constitutive des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} (**ARTICLE 1**). Nos résultats indiquent un doublement de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques chez ces souris mutantes comparées aux souris sauvages, accompagné d'une potentialisation des effets de la paroxétine à la dose de 4 mg/kg (i.p.) sur l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT dans les noyaux du raphé (600%) et le cortex frontal (360%). De manière intéressante, les changements de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques chez les souris doubles mutantes KO 1A/1B sont similaires à ceux observés chez les simples mutantes KO 1A (Richer et al., 2002) suggérant que l'autorécepteur 5-HT_{1A}, mais pas l'autorécepteur 5-HT_{1B}, contrôle la décharge électrique de cette population neuronale. En revanche, les élévations des concentrations extracellulaires de 5-HT détectées dans les noyaux du raphé et le cortex frontal des souris doubles mutantes KO 1A/1B sont supérieures à celles observées au laboratoire, dans les mêmes conditions, chez les souris KO 1A (320% et 280% respectivement dans les noyaux du raphé et le cortex frontal) (Guilloux et al., 2006). Ces résultats semblent donc indiquer que les deux types de récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont impliqués dans la libération de 5-HT dans ces régions cérébrales. Si le rôle des récepteurs 5-HT_{1B} dans le contrôle de la libération de 5-HT

dans les régions terminales est largement décrit, son implication dans le contrôle de la libération de 5-HT au niveau somatodendritique est plus controversé, probablement en raison de sa faible densité dans les noyaux du raphé chez la souris contrairement à ce qui a été observé chez le rat ou le cobaye (Piñeyro et al., 1995a ; Piñeyro et al., 1995b ; El Mansari et Blier, 1996). Il est donc envisageable que les récepteurs 5-HT_{1B} terminaux contrôlent de manière indirecte la libération de 5-HT dans les noyaux du raphé via de longues boucles de rétrocontrôles. On sait par exemple qu'une augmentation de 5-HT dans le cortex frontal peut réguler l'activité des neurones pyramidaux qui se projettent directement dans le noyau dorsal du raphé (Martin-Ruiz et al., 2001 ; Vazquez-Borsetti et al., 2009 ; Vazquez-Borsetti et al., 2011). Ainsi une forte augmentation de 5-HT corticale résultant de l'inactivation des autorécepteurs 5-HT_{1B} terminaux pourrait renforcer l'activité des cellules pyramidales excitatrices sur les noyaux du raphé et favoriser ainsi une libération locale de 5-HT. Cette hypothèse est toutefois à considérer avec certaines précautions car la technique de microdialyse présente certaines limites et notamment le fait que l'intensité d'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT est fortement dépendante des taux de base de 5-HT le jour de l'expérience. Il est ainsi difficile de comparer des études réalisées à des périodes trop éloignées, sur des animaux différents, ici entre les souris KO1A1B (2011) et les souris KO1A (2006).

L'utilisation de souris mutantes constitutives présente certaines limites dont il faut également tenir compte lorsqu'on étudie les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} qui existent à la fois sous forme d'auto- et d'hétéro-récepteurs. Ainsi ces souris KO 5-HT_{1A} et/ou KO 5-HT_{1B} ne permettent pas de dissocier le rôle de l'auto- et de l'hétéro-récepteur. Afin de pallier à ce problème, l'équipe du Dr René Hen à l'université de Columbia (New-York, USA), a créé des souris transgéniques dont l'expression du récepteur 5-HT_{1A} présent spécifiquement sur les neurones sérotoninergiques (auto-récepteur) ou spécifiquement sur les neurones non-sérotoninergique (hétéro-récepteur) peut-être contrôlée. Des souris Auto-KO et leurs contrôles Auto-WT ont été mis à notre disposition afin de déterminer l'impact d'une telle mutation sélective sur le tonus sérotoninergique mesuré en microdialyse (**ARTICLE 2**). Le premier résultat marquant que nous avons obtenu dans cette étude réside dans l'augmentation des concentrations extracellulaires basales de 5-HT dans le cortex des souris Auto-KO comparée aux souris Auto-WT. Ces résultats sont surprenants car un travail récent mené au laboratoire a montré que l'inactivation sélective de l'autorécepteur 5-HT_{1A} dans le noyau du raphé dorsal à l'âge adulte ne modifiait pas les concentrations corticales basales de 5-HT (Richardson-Jones

et al., 2010). Or comme chez les souris Auto-KO, la mutation a été initiée au début de la vie de l'animal, il est donc possible qu'une mutation tardive de l'autorécepteur 5-HT_{1A} ne soit pas suffisante pour affecter le tonus basal sérotoninergique. Il est de plus intéressant de noter que la différence des concentrations extracellulaires basales de 5-HT entre les souris Auto-KO et Auto-WT a été observée dans le cortex, mais pas l'hippocampe. Ces résultats pourraient refléter une différence de densité de site de recapture de la 5-HT selon la région d'intérêt. Des données d'autoradiographie montrent par exemple une densité plus faible de transporteurs sérotoninergiques (SERT) dans le cortex frontal comparé à l'hippocampe chez des souris KO constitutives 5-HT_{1A} (Ase et al., 2001). Ainsi, l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT observée dans le cortex frontal (mais pas dans l'hippocampe) des souris Auto-KO pourrait être attribuée à une réduction spécifique du SERT dans le cortex. Une deuxième hypothèse repose sur l'organisation anatomique du système sérotoninergique. Le cortex frontal est principalement innervé par le noyau du raphé dorsal tandis que l'hippocampe reçoit majoritairement des afférences provenant du noyau du raphé médian (Azmitia et Segal, 1978). Il est donc possible que l'augmentation des concentrations extracellulaires corticales observée chez les souris Auto-KO témoigne d'un plus fort effet de la délétion de l'autorécepteur 5-HT_{1A} sur la libération de 5-HT par les neurones provenant du noyau dorsal du raphé.

Concernant la réponse aux ISRS, nous avons montré que l'augmentation des concentrations extracellulaires de 5-HT induite par une dose challenge de fluoxétine (18 mg/kg i.p.), était potentialisée chez les souris Auto-KO en accord avec la perte du rétrocontrôle inhibiteur. Toutefois, cette potentialisation des effets de la fluoxétine a été observée dans l'hippocampe mais pas dans le cortex frontal. Ces résultats contrastent fortement avec ceux obtenus en conditions basales. Différentes hypothèses peuvent être soulevées pour tenter d'expliquer une telle réponse dépendante de la région cérébrale. Le fait que les concentrations extracellulaires de 5-HT soient élevées en conditions basales chez les souris Auto-KO pourrait, selon le principe d'homéostasie, limiter la capacité des ISRS à renforcer la neurotransmission sérotoninergique (effet plateau). Ceci, sous entend la mise en place de mécanismes compensatoires dont le but serait de pallier à une trop forte augmentation de 5-HT endogène. Ces mécanismes pourraient correspondre à des changements de sensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1B} terminaux comme cela a déjà été décrit chez des souris KO constitutives 5-HT_{1A} (Boutrel et al., 2002). Mais d'autres récepteurs impliqués dans la modulation indirecte de l'activité des neurones sérotoninergiques pourraient

également voir leur expression et/ou leur fonction modifiée lors de la délétion du récepteur 5-HT_{1A}. Parmi les cibles potentielles, les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} ont attiré notre attention puisque différentes études ont permis de montrer que leur stimulation participait à l'inhibition des neurones sérotoninergiques (**ARTICLE 3**).

Si les autorécepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont connus pour leur rôle inhibiteur sur le système sérotoninergique, différentes évidences suggèrent que d'autres sous-types de récepteurs de la 5-HT jouent un rôle majeur dans la régulation de l'activité électrique et de la libération de la 5-HT. En effet, des travaux d'électrophysiologie montrent par exemple que l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} par le DOI ou 5-HT_{2C} par le WAY161503, réduit la décharge électrique des neurones sérotoninergiques, tandis que ces effets peuvent être prévenus par des antagonistes sélectifs ou non sélectifs des récepteurs 5-HT₂ (la kétansérine, le MDL100907 ou le SB242084 (Martin-Ruiz et al., 2001 ; Boothman et al., 2003 ; Boothman et al., 2006 ; Quérée et al., 2009 ; Sotty et al., 2009)). Nous avons reproduit, au cours de ce travail de thèse, ces résultats en essayant d'identifier la (les) région(s) cérébrale(s) impliquées dans les effets des agonistes des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}. Puisque différents travaux suggèrent la présence de ces récepteurs dans le locus coeruleus (Szabo et Blier, 2001 ; Szabo et Blier 2002) et l'aire tegmentale ventrale (Di Matteo et al., 2002 ; Pierucci et al., 2004), deux régions étroitement liées aux neurones sérotoninergiques (Di Giovanni et al., 2008 ; Guiard et al., 2009), nous avons testé les effets du DOI (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2A}) et du WAY161503 (un agoniste des récepteurs 5-HT_{2C}) chez des animaux prétraités avec une neurotoxine, la DSP-4 (N-[2-chloroethyl]-N-ethyl-2-bromobenzylamine), capable de provoquer une ablation du système noradrénergique à la dose de 25 mg/kg (i.p.) ou des systèmes noradrénergique et dopaminergique à la dose de 50 mg/kg (i.p.) (Cassano et al., 2009) (**Figure 26**).

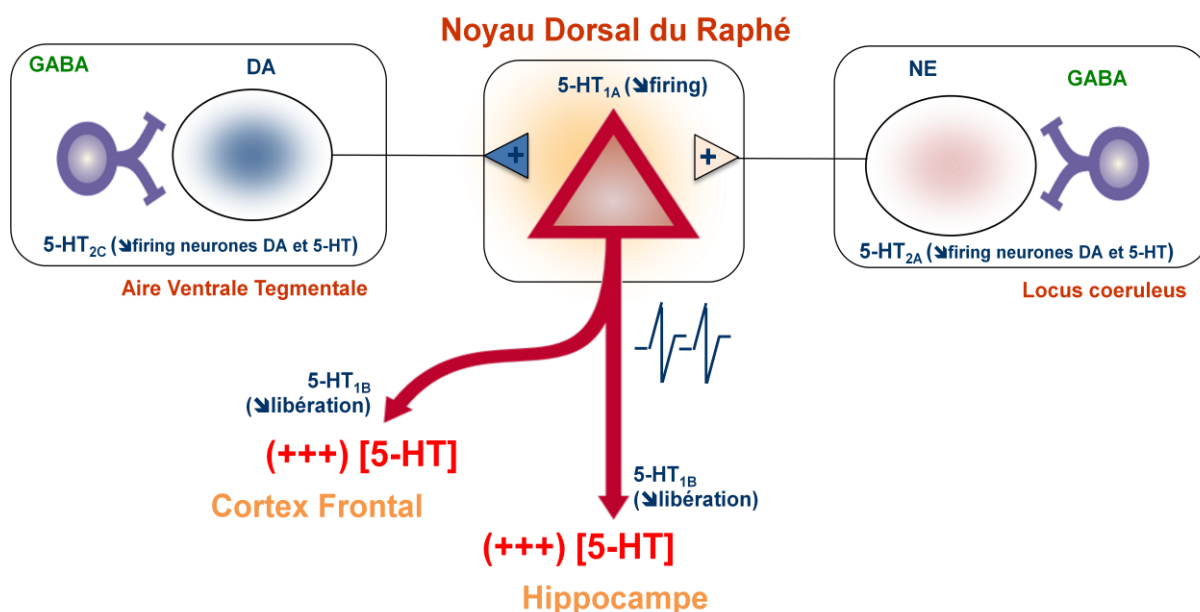


Figure 26: Contrôle de l'activité des neurones sérotoninergiques par les hétéro-récepteurs inhibiteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}

De manière intéressante, l'effet inhibiteur du DOI sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques a été atténué, avec la même intensité, par la DSP-4 aux doses de 25 et 50 mg/kg (dans le LC et l'ATV). Au contraire, l'effet inhibiteur du WAY161503 a été atténué uniquement à la plus forte dose de DSP-4. L'ensemble de ces résultats suggère donc que les hétéro-récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} exercent un rétrocontrôle inhibiteur sur le système sérotoninergique qui passe respectivement par le locus coeruleus et l'aire tegmentale ventrale. Nos résultats sont en accord avec les études de microdialyse montrant que le blocage des récepteurs 5-HT_{2A} et/ou 5-HT_{2C} potentialise les effets d'une dose challenge d'ISRS sur les concentrations extracellulaires de 5-HT dans l'hippocampe (Cremers et al., 2004 ; Cremers et al., 2007 ; Sotty et al., 2009) ou le cortex frontal (Huang et al., 2006 ; Calcagno et al., 2009). A partir de ce travail confirmant l'existence d'hétérorécepteurs impliqués dans l'inhibition du système sérotoninergique, nous avons émis l'hypothèse que les ISRS devaient maintenir un contrôle négatif sur l'activité électrique des neurones sérotoninergiques chez des souris KO constitutives 5-HT_{1A} (**ARTICLE 3**). En effet, nous avons montré que le escitalopram diminue la décharge des neurones 5-HT chez des souris KO 5-HT_{1A}, tandis que cette réponse inhibitrice a pu être inversée par le MDL100907 ou le SB242084, des antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}. Ces résultats sont en contradiction avec ceux décrits par

l'équipe du Dr Artigas en 2004 montrant qu'une dose unique de fluoxétine diminue l'activité électrique des neurones 5-HT chez des souris sauvages, mais pas chez des souris mutantes, privées du récepteur 5-HT_{1A} (Amargos-Bosch et al., 2004). Probablement que le choix de l'ISRS dans cette étude a joué un rôle déterminant dans l'absence de réponse puisque, contrairement au escitalopram, la fluoxétine est capable d'antagoniser les récepteurs 5-HT_{2A/2C} (Ni et Miledi, 1997). Ainsi, cette propriété pharmacologique a probablement prévenu l'effet inhibiteur de l'ISRS chez les souris KO 1A. Afin de déterminer la sensibilité des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} chez ces souris mutantes KO 1A, nous avons examiné la capacité du DOI et du WAY161503 à inhiber l'activité électrique des neurones sérotoninergiques. La réponse électrophysiologique du DOI (mais pas celle du WAY161503) s'est avérée renforcée chez les souris mutantes KO1A suggérant que la délétion de ce récepteur pourrait être compensée par une hypersensibilité du récepteur 5-HT_{2A}. Nous envisageons de confirmer ces résultats par une approche comportementale qui consistera à comparer la capacité du DOI à induire des « mouvements stéréotypés de la tête » (ou « head-twitching ») chez les souris KO_{1A} et WT. Une telle hypersensibilité pourrait expliquer le fait que les ISRS n'ont pas permis de potentialiser les concentrations extracellulaires de 5-HT dans le cortex frontal des souris Auto-KO (**ARTICLE 2**). Fort de ces observations, nous avons réalisé l'étude « opposée » consistant à déterminer la sensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1A} chez des souris KO constitutives pour le récepteur 5-HT_{2A}. Nos résultats ont révélé une hypersensibilité des autorécepteurs 5-HT_{1A} à l'aide de deux tests différents: l'hypothermie ou la réduction de la décharge électrique des neurones 5-HT induite par le 8-OHDPAT. Il apparaît donc clairement qu'il existe une co-régulation à distance entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}, la délétion de l'un entraînant une augmentation d'activité de l'autre. Une telle « interaction fonctionnelle » entre ces deux types de récepteurs a déjà été décrite dans le système nerveux central. Par exemple, l'induction d'un syndrome sérotoninergique induit par un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} est potentialisé par un antagoniste des récepteurs 5-HT_{2A/2C} (Backus et al., 1990 ; Sharp et al., 1990). Au contraire l'induction de « head-twitching » par le DOI est réduite par l'administration d'un agoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (Berendsen et al., 1990 ; Darmani et al., 1990 ; Dursun et Handley, 1993). Autre preuve de l'interaction fonctionnelle entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A}: un traitement chronique avec un ISRS produit une désensibilisation fonctionnelle de l'autorécepteur 5-HT_{1A}, accompagnée d'une augmentation de la sensibilité du récepteur 5-HT_{2A} (Cadogan et al., 1993 ; Li et al., 1997). Il est donc possible que les effets des ISRS passent par une diminution de la sensibilité du récepteur 5-HT_{1A} et une augmentation de celle du récepteur 5-HT_{2A}. Cette hypothèse est en

accord avec différentes études cliniques montrant que les patients dépressifs en rémission sous ISRS présentent une augmentation de la densité des récepteurs 5-HT_{2A} dans le cortex frontal (Hrdina et al., 1993 ; Massou et al., 1997 ; Yamauchi et al., 2006).

Les autorécepteurs 5-HT_{1A/1B} et les hétéro-récepteurs 5-HT_{2A/2C} sont donc au cœur de la régulation du système sérotoninergique et de la réponse aux ISRS. Il est important de souligner que les résultats décrits ci-dessous ont été obtenus chez des animaux naïfs, en conditions non pathologiques. Or il apparaît plus approprié de mener des études chez des modèles animaux présentant des troubles anxio-dépressifs. A ce jour, différents modèles ont été décrits et utilisés pour tester les effets des antidépresseurs et déterminer leur mécanisme d'action. Il existe des lignées de souris ou des rats, sélectionnés sur plusieurs générations, qui présentent un phénotype dit « résigné » (Overstreet, 1993 ; El Yacoubi et al., 2003). Il existe également des modèles de stress comme le stress modéré chronique imprévisible (de Paul Willner) ou le stress de séparation maternelle (Papp et al., 1996), qui perturbent l'axe hypothalamo-hypophysaire, et induisent des comportements de type anxio-dépressif (Nestler et Hyman, 2010). Malgré tout, ces modèles sont difficiles à mettre en place de part la lourdeur des protocoles de stress et/ou leur faible reproductibilité chez la Souris. Pour pallier à ce problème, nous avons participé à la mise au point d'un modèle de souris (d'abord chez le Dr René Hen, Columbia University, NY, puis à son installation ici à Châtenay) présentant plusieurs traits caractéristiques d'un état anxio/dépressif (anhédonie, désespoir), basé sur l'administration de corticostérone dans l'eau de boisson (David et al., 2009). Sur ce modèle, nous avons cherché à déterminer le statut fonctionnel de l'autorécepteur 5-HT_{1A} en présence (ou pas) d'un ISRS, la fluoxétine administrée pendant 4 semaines (**ARTICLE 4**). De manière surprenante, nous avons observé une désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A} chez les animaux traités à la corticostérone tout comme chez animaux contrôles ayant reçu la fluoxétine. Ainsi le statut fonctionnel des autorécepteurs 5-HT_{1A} est similaire en conditions pathologiques ou thérapeutiques. Il n'est donc pas surprenant que la combinaison (corticostérone + fluoxétine) ait renforcé la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. L'effet additif de ces deux agents sur le statut fonctionnel de l'autorécepteur 5-HT_{1A} résulte probablement de mécanismes indépendants. Si le mécanisme à l'origine de la désensibilisation induite par la fluoxétine est à ce jour bien décrit, résultant d'une accumulation de 5-HT endogène consécutive au blocage du SERT dans le noyau dorsal (Blier et al., 1998), celui de la corticostérone reste mal connu. Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées et la plus probable réside dans une down-régulation directe du récepteur 5-HT_{1A} par

les récepteurs aux glucocorticoïdes présent sur les neurones sérotoninergiques (Härfstrand et al., 1986), ces derniers ayant la capacité de limiter le couplage du récepteur à sa protéine G (Fairchild et al., 2003). Une autre possibilité serait que la corticostérone stimule la synthèse de 5-HT dans le noyau dorsal du raphé via une activation de la tryptophane hydroxylase (Clark et al., 2008). L'excès de 5-HT pourrait alors être libéré localement dans le noyau dorsal du raphé et participerait ainsi à la désensibilisation de l'autorécepteur 5-HT_{1A}. Enfin, des données récentes suggèrent que la corticostérone pourrait favoriser l'accumulation de 5-HT endogène via le blocage de récepteur à faible affinité de la sérotonine tels que les OCT ou les PMAT (Baganz et al., 2010). Des travaux complémentaires sont actuellement en cours afin d'évaluer la sensibilité des hétéro-récepteurs 5-HT_{2A} dans ce modèle de souris traitées à la corticostérone. Des travaux antérieurs laissent penser que l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes par la corticostérone exogène augmente la densité de récepteur 5-HT_{2A} dans des cultures organotypiques d'hippocampe (Trajkovska et al., 2009). Ces résultats montrent une augmentation de la densité et/ou du statut fonctionnel des récepteurs 5-HT_{2A} chez des souris traitées à la corticostérone. L'interaction réciproque entre les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{2A} décrite ci-dessus chez les animaux contrôles, pourrait également avoir son importance dans la manifestation de la pathologie anxio-dépressive (Kuroda et al., 1992).

Dans une dernière partie de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés au mécanisme d'action du escitalopram et à sa capacité à moduler directement l'activité du système noradrénergique central (**ARTICLE 5**). Comme nous l'avons indiqué plus haut, il existe des liens anatomiques et fonctionnels étroits entre les neurones 5-HT du noyau du raphé dorsal et les neurones NA du locus coeruleus (Guiard et al., 2009). Or, différentes études de microdialyse réalisée chez le rat ou la souris ont montré que, en dépit de leur sélectivité démontrée *in vitro*, les ISRS sont capables *in vivo* d'augmenter les concentrations extracellulaires de NA dans différentes régions cérébrales (Jordan et al., 1994; Shachar et al., 1997; Millan et al., 2001; Beyer et al., 2002; Bymaster et al., 2002; Koch et al., 2002; David et al., 2003; Kobayashi et al., 2008). Nous avons étendu dans ce travail de thèse ces observations avec l'inhibiteur de recapture le plus sélectif actuellement disponible, le escitalopram. Les raisons d'un tel impact du escitalopram sur la neurotransmission noradrénergique restent toutefois mal connues. Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées et notamment le fait que l'augmentation de 5-HT endogène induite par les ISRS stimule les neurones NA (hypothèse indirecte). Au niveau somatodendritique, cela s'avère peu probable puisqu'au contraire, différentes études rapportent que les ISRS, dont le escitalopram,

diminuent l'activité électrique des neurones NA via l'activation des récepteurs 5-HT_{2A} situés dans le locus coeruleus sur des interneurons à GABA (Szabo et Blier, 2002). Au niveau terminal, les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₃ sont exprimés sur les synapses noradrénergiques et leur stimulation permet d'activer la libération de NA (Mongeau et al., 1994 ; Hajós-Korcsok et al., 1999). Au cours de notre travail, nous avons exploré une autre hypothèse : les ISRS, et plus particulièrement le escitalopram, augmenteraient-ils les concentrations extracellulaires corticales de NA en bloquant de manière non sélective le transporteur de la NA (NAT). Cette hypothèse est envisageable dans la mesure où différents travaux réalisés chez l'homme ont montré un tel effet (Gilmor et al., 2002). L'observation que le escitalopram (administré de manière systémique ou locale dans le cortex frontal), a augmenté les concentrations extracellulaires à la fois chez des souris sauvages et des souris mutantes privées du transporteur SERT (KO SERT) de la 5-HT suggère que les effets neurochimiques de l'antidépresseur sur le système noradrénergique mobilise une autre cible que le SERT. Afin de préciser si cette cible était le NAT, nous avons dans un second temps évalué les effets du escitalopram sur les concentrations extracellulaires corticales de NA chez des souris sauvages prétraitées avec de la desipramine, de manière à saturer le site de recapture de haute affinité de la noradrénaline. De manière attendue, la desipramine utilisée seule à la dose de 10 mg/kg a provoqué une augmentation significative des concentrations extracellulaires corticales de NA, tandis que le escitalopram n'a plus été capable de modifier ces concentrations en présence de desipramine confortant ainsi l'hypothèse d'une action de l'ISRS sur le NAT. Bien sûr, ces résultats ne sont pas parfaits dans la mesure où l'absence d'effet du escitalopram pourrait être due à un phénomène de plateau. En effet, comme nous l'avons déjà envisagé dans cette discussion, lors d'expériences de microdialyse, nous sommes souvent confronté au fait qu'il est difficile d'augmenter des concentrations extracellulaires de monoamines lorsque ces dernières sont déjà élevées. S'agit-il des limites de la technique et/ou des systèmes biologiques qui s'organisent pour prévenir toutes augmentations incontrôlées du neurotransmetteur mettant en jeu des mécanismes compensatoires ? Ces points restent aujourd'hui en suspens et méritent d'être abordés à l'aide de techniques complémentaires. La technique d'iontophorèse, par exemple, devrait permettre de conforter ou d'invalidier nos résultats. En effet, à l'aide de cette technique, il est possible d'appliquer certains agents pharmacologiques sur les cellules en cours d'enregistrement, comme par exemple, les neurones pyramidaux qui constituent de bons modèles d'étude car elles sont sensibles à une application de NA, ce qui inhibe l'activité électrique de ces neurones. La durée de cette inhibition est d'autant plus importante que la NA reste présente au contact des cellules

(Kasamo et al., 1996). Ainsi, l'inhibition des neurones pyramidaux de l'hippocampe induite par la NA est prolongée en présence d'un inhibiteur sélectif/ou non sélectif de recapture de la NA tels que la désipramine, la réboxétine ou la duloxétine (Kasamo et al., 1996). Si le escitalopram bloque effectivement le NAT, il devrait mimer les effets des IRNs dans ce test. Ces données sont actuellement en cours d'acquisition au laboratoire et devraient permettre de conclure définitivement quant à la sélectivité *in vivo* des ISRS vis à vis des transporteurs monoaminergiques (**Figure 27**).

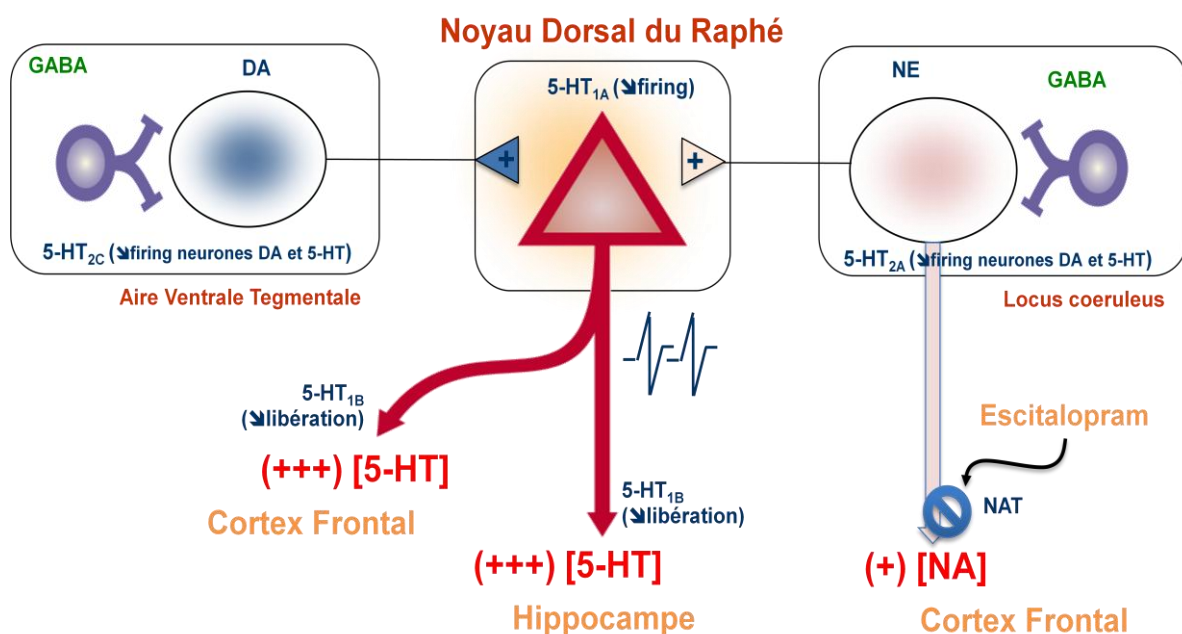


Figure 27: Les cibles sérotoninergiques/non sérotoninergiques impliqués dans les effets des ISRS dont le escitalopram

CONCLUSIONS

L'ensemble de ces travaux mets en lumière la complexité des mécanismes cellulaires et moléculaires régulant l'activité du système sérotoninergique central que ce soit en conditions basales ou en réponse à un traitement par un ISRS administré de manière aigue ou chronique chez la Souris. Différents acteurs entrent en jeu dans cette régulation, chacun ayant un rôle et une localisation cellulaire et tissulaire cérébrale bien définies. La principale cible de ces antidépresseurs est le transporteur de la 5-HT et certains d'entre eux ont une plus grande sélectivité vis à vis du SERT. C'est le cas du escitalopram dont les études *in vitro* démontrent qu'il présente une affinité pour le SERT, 7000 à 25000 fois plus élevée que pour le NAT et le DAT. Toutefois, ces grandes différences ne se reflètent pas sur son activité *in vivo* car le escitalopram augmente les concentrations de 5-HT et de NA (par exemple ici dans le cortex frontal) avec un ratio d'environ 2/1, ce qui nous permet de proposer que l'inhibiteur le plus sélectif de la recapture de la 5-HT actuellement disponible est également capable de bloquer le transporteur de la NA *in vivo* chez la Souris.

Les autorécepteurs somatodendritiques 5-HT_{1A} et terminaux 5-HT_{1B} situés sur les neurones sérotoninergiques sont des cibles indirectes des ISRS qui contribuent à maintenir une concentration stable de 5-HT intra-synaptique. Lorsque ces freins biologiques sont désensibilisés (par exemple lors d'un traitement ISRS chronique), ils ne peuvent plus exercer leur rôle de rétrocontrôle négatif sur l'activité électrique des neurones, la synthèse et la libération de 5-HT. Les autorécepteurs seraient alors suppléés par d'autres récepteurs sérotoninergiques situés à distance. C'est le cas des hétéro-récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} situés sur les neurones catecholaminergiques dans le locus coeruleus et l'aire tegmentale ventrale, qui continuent de maintenir une fonction inhibitrice indirecte sur les neurones sérotoninergiques lors de l'inactivation des autorécepteurs. D'un point de vue thérapeutique, ces données sont importantes car elles suggèrent que le blocage pharmacologique des autorécepteurs par des antagonistes sélectifs n'est pas la seule solution pour améliorer l'activité des ISRS. Même si certaines stratégies de potentialisation visant à co-administrer un ISRS avec un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1A} (pindolol) ont permis d'obtenir des résultats cliniques encourageants (Plenge et Mellerup, 2003 ; Portella et al., 2011), il n'en demeure pas moins que certains patients dépressifs sont encore résistants à cette co-administration ou observent une amélioration trop tardive de leur humeur. Le blocage simultané des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} apporterai un bénéfice supplémentaire pour stimuler la libération de 5-HT

dans les régions terminales. En accord avec cette hypothèse, les antipsychotiques atypiques tels que l'olanzapine, la risperidone ou l'aripiprazole, qui antagonisent les récepteurs 5-HT_{2A} avec une bonne puissance, s'avèrent utiles chez certains patients résistants aux ISRS (Tremblay et Blier, 2006). Nous avons montré à l'aide d'antagonistes, que les récepteurs 5-HT_{2A} localisés dans des régions cérébrales comme le cortex frontal ou l'hippocampe, jouent un rôle important, cependant leur activation est nécessaire pour obtenir une réponse antidépressive. C'est là tout le challenge de la recherche qui devra probablement développer dans les années à venir des stratégies permettant par exemple de cibler certains sous-types de récepteurs dans certaines régions cérébrales et pas dans d'autres.

PERSPECTIVES

Les derniers résultats, tout à fait innovants, décryptent l'activité des neurones sérotoninergiques ou non sérotoninergiques et leurs fortes interactions suite à l'administration d'ISRS chez des souris mutantes KO SERT, ou bien KO 5-HT_{1A} (lors de manipulations séparées des populations d'auto- et d'hétéro-récepteurs : Richardson-Jones et al., 2011), KO 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C}.

Enfin, grâce à une collaboration avec l'équipe de Sophie Gautron (*UPMC Université Paris VI*), nous avons montré que le escitalopram, à des concentrations comparables à celle utilisées *in vivo*, n'inhibe pas *in vitro* la recapture de NA et de 5-HT médiée par les transporteurs des monoamines de faible affinité (OCT) dans le cortex de souris.

Tous ces résultats ouvrent de nouveaux horizons pour comprendre les mécanismes d'actions des antidépresseurs de type ISRS dans le traitement de la dépression chez l'Homme. Pour cela, ces modèles animaux constituent des outils de choix pour développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et améliorer les compréhension des mécanismes centraux mis en jeu dans les pathologies dépressives. Par ailleurs, il sera important de poursuivre l'exploration du rôle de rétrocontrôle inhibiteur des récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2C} sur les neurones sérotoninergiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi YU, Yamada S, Satomoto M, Higuchi H, Watanabe K, et al.** (2008). Isoflurane anesthesia inhibits clozapine- and risperidone-induced dopamine release and anesthesia-induced changes in dopamine metabolism was modified by fluoxetine in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurochem Int.* 52(3):384-91.
- Adell A, Artigas F** (1999). Regulation of the release of 5-hydroxytryptamine in the median raphe nucleus of the rat by catecholaminergic afferents. *Eur J Neurosci.* 11(7):2305-11.
- Adrien J, Lanfumey L, Gozlan H, Fattaccini CM, et al.** (1989). Biochemical and electrophysiological evidence for an agonist action of CM 57493 at pre- and postsynaptic 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 248(3): 1222-1230.
- Aghajanian GK, Bloom FE** (1967). Localization of tritiated serotonin in rat brain by electron-microscopic autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther.* 156(1):23-30.
- Aina Y, Susman JL** (2006). Understanding comorbidity with depression and anxiety disorders. *J Am Osteopath Assoc.* 106(5 Suppl 2):S9-14.
- Albert PR, François BL** (2010). Modifying 5-HT_{1A} Receptor Gene Expression as a New Target for Antidepressant Therapy. *Front Neurosci.* 4:35.
- Albert PR, Lembo P, Storrington JM, Charest A, Saucier C** (1996). The 5-HT_{1A} receptor: signaling, desensitization, and gene transcription. *Neuropsychopharmacology.* 14(1):19-25.
- Albert PR, Lemonde S** (2004). 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist.* 10(6):575-93.
- Albert PR, Zhou QY, Van Tol HH, Bunzow JR, Civelli O** (1990). Cloning, functional expression, and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine_{1A} receptor gene. *J Biol Chem.* 265(10):5825-32.
- Alexandre C, Popa D, Fabre V, Bouali S, Venault P, et al.** (2006). Early life blockade of 5-hydroxytryptamine _{1A} receptors normalizes sleep and depression-like behavior in adult knock-out mice lacking the serotonin transporter. *J Neurosci.* 26(20):5554-64.
- Amargós-Bosch M, Adell A, Bortolozzi A, Artigas F** (2003). Stimulation of alpha₁-adrenoceptors in the rat medial prefrontal cortex increases the local in vivo 5-hydroxytryptamine release: reversal by antipsychotic drugs. *J Neurochem.* 87(4):831-42.
- Amargós-Bosch M, Artigas F, Adell A** (2005). Effects of acute olanzapine after sustained fluoxetine on extracellular monoamine levels in the rat medial prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol.* 516(3):235-8.
- Amargós-Bosch M, Bortolozzi A, Puig MV, Serrats J, et al.** (2004). Co-expression and in vivo interaction of serotonin_{1A} and serotonin_{2A} receptors in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *Cereb Cortex.* 14(3):281-99.

- Amphoux A, Vialou V, Drescher E, Brüss M, Mannoury La Cour C, et al.** (2006). Differential pharmacological in vitro properties of organic cation transporters and regional distribution in rat brain. *Neuropharmacology*. 50(8):941-52.
- Andreoli V, Caillard V, Deo RS, Rybakowski JK, Versiani M** (2002). Reboxetine, a new noradrenaline selective antidepressant, is at least as effective as fluoxetine in the treatment of depression. *J Clin Psychopharmacol*. 22(4):393-9.
- Arango V, Underwood MD, Boldrini M, Tamir H, Kassir SA, et al.** (2001). Serotonin 1A receptors, serotonin transporter binding and serotonin transporter mRNA expression in the brainstem of depressed suicide victims. *Neuropsychopharmacology*. 25(6):892-903.
- Arborelius L, Linnér L, Wallsten C, Ahlenius S, Svensson TH** (2000). Partial 5-HT_{1A} receptor agonist properties of (-)pindolol in combination with citalopram on serotonergic dorsal raphe cell firing in vivo. *Psychopharmacology (Berl)*. 151(1):77-84.
- Arborelius L, Nomikos GG, Hertel P, Salmi P, Grillner P, et al.** (1996). The 5-HT_{1A} receptor antagonist (S)-UH-301 augments the increase in extracellular concentrations of 5-HT in the frontal cortex produced by both acute and chronic treatment with citalopram. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 353(6):630-40.
- Arias B, Catalán R, Gastó C, Gutiérrez B, Fañanás L** (2003). 5-HTTLPR polymorphism of the serotonin transporter gene predicts non-remission in major depression patients treated with citalopram in a 12-weeks follow up study. *J Clin Psychopharmacol*. 23(6):563-7.
- Arias B, Catalán R, Gastó C, Gutiérrez B, Fañanás L** (2005). Evidence for a combined genetic effect of the 5-HT_{1A} receptor and serotonin transporter genes in the clinical outcome of major depressive patients treated with citalopram. *J Psychopharmacol*. 19(2):166-72.
- Arnt J, Christensen AV, Hyttel J** (1985). Pharmacology in vivo of the phenylindan derivative, Lu 19-005, a new potent inhibitor of dopamine, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine uptake in rat brain. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 329(2):101-7.
- Arranz B, Eriksson A, Mellerup E, Plenge P, Marcusson J** (1994). Brain 5-HT_{1A}, 5-HT_{1D}, and 5-HT₂ receptors in suicide victims. *Biol Psychiatry*. 35(7):457-63.
- Artigas F, Adell A, Celada P** (1994). Pindolol augmentation of antidepressant response. *Curr Drug Targets*. 7(2):139-47.
- Artigas F, Nutt DJ, Shelton R** (2002). Mechanism of action of antidepressants. *Psychopharmacol Bull*. 36 Suppl 2:123-32.
- Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P** (1996). Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT_{1A} antagonists. *Trends Neurosci*. 19(9):378-83.
- Ase AR, Reader TA, Hen R, Riad M, Descarries L** (2001). Regional changes in density of serotonin transporter in the brain of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} knockout mice, and of serotonin innervation in the 5-HT_{1B} knockout. *J Neurochem*. 78(3):619-30.

- Auerbach SB, Hjorth S** (1995). Effect of chronic administration of the selective serotonin (5-HT) uptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT and apparent autoreceptor sensitivity in rat forebrain in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 352(6):597-606.
- Austin MC, Whitehead RE, Edgar CL, Janosky JE, Lewis DA** (2002). Localized decrease in serotonin transporter-immunoreactive axons in the prefrontal cortex of depressed subjects committing suicide. *Neuroscience.* 114(3):807-15.
- Azmitia EC, Segal M** (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 179(3):641-67.
- Aznavour N, Zimmer L** (2007). [18F]MPPF as a tool for the in vivo imaging of 5-HT_{1A} receptors in animal and human brain. *Neuropharmacology.* 52(3):695-707.
- Backus LI, Sharp T, Grahame-Smith DG** (1990). Behavioural evidence for a functional interaction between central 5-HT₂ and 5-HT_{1A} receptors. *Br J Pharmacol.* 100(4):793-9.
- Bacq A, Balasse L, Biala G, Guiard B, Gardier AM, et al.** (2011). Organic cation transporter 2 controls brain norepinephrine and serotonin clearance and antidepressant response. *Mol Psychiatry.* doi: 10.1038/mp.2011.87.
- Baganz N, Horton R, Martin K, Holmes A, Daws LC** (2010). Repeated swim impairs serotonin clearance via a corticosterone-sensitive mechanism: organic cation transporter 3, the smoking gun. *J Neurosci.* 30(45):15185-95.
- Ballesteros J, Callado LF** (2004). Effectiveness of pindolol plus serotonin uptake inhibitors in depression: a meta-analysis of early and late outcomes from randomised controlled trials. *J Affect Disord.* 79(1-3):137-47.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A** (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology.* 29(3):450-60.
- Baraban JM, Aghajanian GK** (1980). Suppression of serotonergic neuronal firing by alpha-adrenoceptor antagonists: evidence against GABA mediation. *Eur J Pharmacol.* 66(4):287-94.
- Barker EL, Blakely RD** (1996). Identification of a single amino acid, phenylalanine 586, that is responsible for high affinity interactions of tricyclic antidepressants with the human serotonin transporter. *Mol Pharmacol.* 50(4):957-65.
- Baune BT, Hohoff C, Roehrs T, Deckert J, Arolt V, et al.** (2009). Serotonin receptor 1A-1019C/G variant: impact on antidepressant pharmacoresponse in melancholic depression? *Neurosci Lett.* 436(2):111-5.
- Baxter G, Kennett G, Blaney F, Blackburn T** (1995). 5-HT₂ receptor subtypes: a family re-united? *Trends Pharmacol Sci.* 16(3):105-10.
- Bel N, Artigas F** (1992). Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol.* 229(1):101-3.

- Bel N, Artigas F** (1996). In vivo effects of the simultaneous blockade of serotonin and norepinephrine transporters on serotonergic function. Microdialysis studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 278(3):1064-72.
- Bengel D, Jöhren O, Andrews AM, Heils A, Mössner R, et al.** (1997). Cellular localization and expression of the serotonin transporter in mouse brain. *Brain Res,* 778(2): 338-345.
- Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, et al.** (1998). Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. *Mol Pharmacol* 53(4): 649-655.
- Berendsen HH, Broekkamp CL, Van Delft AM** (1990). Antagonism of 8-OH-DPAT-induced behaviour in rats. *Eur J Pharmacol.* 187(1):97-103.
- Berg KA, Cropper JD, Niswender CM, Sanders-Bush E, Emeson RB, Clarke WP** (2001). RNA-editing of the 5-HT_{2C} receptor alters agonist-receptor-effector coupling specificity. *Br J Pharmacol.* 134(2):386-92.
- Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP** (2005). Physiological relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 26(12):625-30.
- Berg KA, Harvey JA, Spampinato U, Clarke WP** (2008). Physiological and therapeutic relevance of constitutive activity of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors for the treatment of depression. *Prog Brain Res.* 172:287-305.
- Bergqvist PB, Dong J, Blier P** (1999). Effect of atypical antipsychotic drugs on 5-HT₂ receptors in the rat orbito-frontal cortex: an in vivo electrophysiological study. *Psychopharmacology (Berl).* 143(1):89-96.
- Bermack JE, Haddjeri N, Debonnel G** (2004). Effects of the potential antidepressant OPC-14523 [1 - [3 - [4 - (3 - chlorophenyl)-1 - piperazinyl]propyl] - 5 - methoxy - 3,4-dihydro - 2-quinolinone monomethanesulfonate] a combined sigma and 5-HT_{1A} ligand: modulation of neuronal activity in the dorsal raphe nucleus. *J Pharmacol Exp Ther.* 310(2):578-83.
- Berman RM, Anand A, Cappiello A, Miller HL, Hu XS, et al.** (1999). The use of pindolol with fluoxetine in the treatment of major depression: final results from a double-blind, placebo-controlled trial. *Biol Psychiatry.* 45(9):1170-7.
- Berman RM, Darnell AM, Miller HL, Anand A, Charney DS** (1997). Effect of pindolol in hastening response to fluoxetine in the treatment of major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry.* 154(1):37-43.
- Berman RM, Fava M, Thase ME, Trivedi MH, Swanink R, et al.** (2009). Aripiprazole augmentation in major depressive disorder: a double-blind, placebo-controlled study in patients with inadequate response to antidepressants. *CNS Spectr.* 14(4):197-206.
- Berridge CW, Waterhouse BD** (2003). The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res Brain Res Rev.* 42(1):33-84.

- Bert L, Favale D, Jegu G, Greve P, Guilloux JP, et al.** (2004). Rapid and precise method to locate microdialysis probe implantation in the rodent brain. *J Neurosci Methods* 140(1-2): 53-57.
- Beskow J, Gottfries CG, Roos BE, Winblad B** (1976). Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatr Scand.* 53(1):7-20.
- Beyer CE, Boikess S, Luo B, Dawson LA** (2002). Comparison of the effects of antidepressants on norepinephrine and serotonin concentrations in the rat frontal cortex: an in-vivo microdialysis study. *J Psychopharmacol.* 16(4): 297-304.
- Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ** (2004). Persistent reduction in brain serotonin_{1A} receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Mol Psychiatry.* 9(4):386-92.
- Bishop JR, Moline J, Ellingrod VL, Schultz SK, Clayton AH** (2006). Serotonin 2A -1438 G/A and G-protein Beta3 subunit C825T polymorphisms in patients with depression and SSRI-associated sexual side-effects. *Neuropsychopharmacology.* 31(10):2281-8.
- Blakely RD, Berson HE, Freneau RT Jr, Caron MG, Peek MM, et al.** (1991). Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature.* 354(6348):66-70.
- Blier P** (2001). Pharmacology of rapid-onset antidepressant treatment strategies. *J Clin Psychiatry.* 62 Suppl 15:12-7.
- Blier P** (2003). The pharmacology of putative early-onset antidepressant strategies. *Eur Neuropsychopharmacol.* 13(2):57-66.
- Blier P, Bergeron R** (1995). Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol.* 15(3):217-22.
- Blier P, Bergeron R** (1995). Effectiveness of pindolol with selected antidepressant drugs in the treatment of major depression. *J Clin Psychopharmacol.* 15(3):217-22.
- Blier P, Bergeron R, de Montigny C** (1997). Selective activation of postsynaptic 5-HT_{1A} receptors induces rapid antidepressant response. *Neuropsychopharmacology.* 16(5):333-8.
- Blier P, Blondeau C** (2011). Neurobiological bases and clinical aspects of the use of aripiprazole in treatment-resistant major depressive disorder. *J Affect Disord.* 128 Suppl 1:S3-10.
- Blier P, De Montigny C** (1983). Electrophysiological investigations on the effect of repeated zimelidine administration on serotonergic neurotransmission in the rat. *J Neurosci.* 3(6):1270-8.
- Blier P, de Montigny C** (1987). Modification of 5-HT neuron properties by sustained administration of the 5-HT_{1A} agonist gepirone: electrophysiological studies in the rat brain. *Synapse,* 1(5): 470-480.
- Blier P, de Montigny C** (1994). Current advances and trends in the treatment of depression. *Trends Pharmacol Sci.* 15(7):220-6.
- Blier P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C** (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Ann N Y Acad Sci.* 861:204-16.

- Bloch MH, Landeros-Weisenberger A, Kelmendi B, Coric V, Bracken MB, et al.** (2006). A systematic review: antipsychotic augmentation with treatment refractory obsessive-compulsive disorder. *Mol Psychiatry*. 11(7):622-32.
- Bockaert J, Dumuis A, Bouhelal R, Sebben M, et al.** (1987). Piperazine derivatives including the putative anxiolytic drugs, buspirone and ipsapirone, are agonists at 5-HT_{1A} receptors negatively coupled with adenylate cyclase in hippocampal neurons. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 335(5): 588-592.
- Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V** (2008). Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res*. 42(6):433-42.
- Bondolfi G, Eap CB, Bertschy G, Zullino D, Vermeulen A, et al.** (2002). The effect of fluoxetine on the pharmacokinetics and safety of risperidone in psychotic patients. *Pharmacopsychiatry*. 35(2):50-6.
- Boothman L, Raley J, Denk F, Hirani E, Sharp T** (2006). In vivo evidence that 5-HT_{2C} receptors inhibit 5-HT neuronal activity via a GABAergic mechanism. *Br J Pharmacol*. 149(7):861-9.
- Boothman LJ, Allers KA, Rasmussen K, Sharp T** (2003). Evidence that central 5-HT_{2A} and 5-HT_{2B/C} receptors regulate 5-HT cell firing in the dorsal raphe nucleus of the anaesthetised rat. *Br J Pharmacol*. 139(5):998-1004.
- Boothman LJ, Sharp T** (2005). A role for midbrain raphe gamma aminobutyric acid neurons in 5-hydroxytryptamine feedback control. *Neuroreport*. 16(9):891-6.
- Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Adell A, Díaz-Mataix L, Serrats J, et al.** (2003). In vivo modulation of 5-hydroxytryptamine release in mouse prefrontal cortex by local 5-HT_{2A} receptors: effect of antipsychotic drugs. *Eur J Neurosci*. 18(5):1235-46.
- Bortolozzi A, Amargós-Bosch M, Toth M, Artigas F, Adell A** (2004). In vivo efflux of serotonin in the dorsal raphe nucleus of 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *J Neurochem*. 88(6):1373-9.
- Bortolozzi A, Artigas F** (2003). Control of 5-hydroxytryptamine release in the dorsal raphe nucleus by the noradrenergic system in rat brain. Role of alpha-adrenoceptors. *Neuropsychopharmacology*. 28(3):421-34.
- Bortolozzi A, Castañé A, Semakova J, Santana N, Alvarado G, et al.** (2011). Selective siRNA-mediated suppression of 5-HT_{1A} autoreceptors evokes strong anti-depressant-like effects. *Mol Psychiatry*. [Epub ahead of print]
- Bosker F, Vrinten D, Klompmakers A, Westenberg H** (1997). The effects of a 5-HT_{1A} receptor agonist and antagonist on the 5-hydroxytryptamine release in the central nucleus of the amygdala: a microdialysis study with flesinoxan and WAY 100635. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 355(3):347-53.

- Bosker FJ, van Esseveldt KE, Klompmakers AA, Westenberg HG** (1995). Chronic treatment with fluvoxamine by osmotic minipumps fails to induce persistent functional changes in central 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors, as measured by in vivo microdialysis in dorsal hippocampus of conscious rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 117(3):358-63.
- Bourin M, Chenu F, Prica C, Hascoët M** (2009). Augmentation effect of combination therapy of aripiprazole and antidepressants on forced swimming test in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 206(1):97-107.
- Bourin M, Redrobe JP, Baker GB** (1998). Pindolol does not act only on 5-HT_{1A} receptors in augmenting antidepressant activity in the mouse forced swimming test. *Psychopharmacology (Berl)*. 136(3):226-34.
- Boutrel B, Monaca C, Hen R, Hamon M, Adrien J** (2002). Involvement of 5-HT_{1A} receptors in homeostatic and stress-induced adaptive regulations of paradoxical sleep: studies in 5-HT_{1A} knock-out mice. *J Neurosci*. 22(11):4686-92.
- Bozina N, Peles AM, Sagud M, Bilusic H, Jakovljevic M** (2008). Association study of paroxetine therapeutic response with SERT gene polymorphisms in patients with major depressive disorder. *World J Biol Psychiatry*. 9(3):190-7.
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, et al.** (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry*. 157(1):115-8.
- Bristow LJ, O'Connor D, Watts R, Duxon MS, Hutson PH** (2000). Evidence for accelerated desensitisation of 5-HT_{2C} receptors following combined treatment with fluoxetine and the 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100,635, in the rat. *Neuropharmacology*. 39(7):1222-36.
- Bunin MA, Wightman RM** (1998). Quantitative evaluation of 5-hydroxytryptamine (serotonin) neuronal release and uptake: an investigation of extrasynaptic transmission. *J Neurosci*. 18(13):4854-60.
- Bunney WE Jr, Davis JM** (1965). Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry*. 13(6):483-94.
- Burke WJ, Gergel I, Bose A** (2002). Fixed-dose trial of the single isomer SSRI escitalopram in depressed outpatients. *J Clin Psychiatry*. 63(4):331-6.
- Burnet PW, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ** (1995a). The distribution of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor mRNA in human brain. *Brain Res*, 676(1): 157-168.
- Burnet PW, Mead A, Eastwood SL, Lacey K, Harrison PJ, et al.** (1995b). Repeated ECS differentially affects rat brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor expression. *Neuroreport*. 6(6):901-4.
- Burns CM, Chu H, Rueter SM, Hutchinson LK, Canton H, et al.** (1997). Regulation of serotonin-2C receptor G-protein coupling by RNA editing. *Nature*. 387(6630):303-8.
- Burstein E, Ma J, Wong S, Gao Y, Pham E, et al.** (2005). Intrinsic efficacy of antipsychotics at human D₂, D₃, and D₄ dopamine receptors: identification of the clozapine metabolite N-desmethylclozapine as a D₂/D₃ partial agonist. *J Pharmacol Exp Ther*. 315(3):1278-87.

- Bymaster FP, Dreshfield-Ahmad LJ, Threlkeld PG, Shaw JL, Thompson L, et al.** (2001). Comparative affinity of duloxetine and venlafaxine for serotonin and norepinephrine transporters in vitro and in vivo, human serotonin receptor subtypes, and other neuronal receptors. *Neuropsychopharmacology*. 25(6):871-80.
- Bymaster FP, Zhang W, Carter PA, Shaw J, Chernet E, et al.** (2002). Fluoxetine, but not other selective serotonin uptake inhibitors, increases norepinephrine and dopamine extracellular levels in prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl)* 160(4): 353-361.
- Cadogan AK, Marsden CA, Tulloch I, Kendall DA** (1993). Evidence that chronic administration of paroxetine or fluoxetine enhances 5-HT₂ receptor function in the brain of the guinea pig. *Neuropharmacology*. 32(3):249-56.
- Calcagno E, Carli M, Baviera M, Invernizzi RW** (2009). Endogenous serotonin and serotonin_{2C} receptors are involved in the ability of M100907 to suppress cortical glutamate release induced by NMDA receptor blockade. *J Neurochem*. 108(2):521-32.
- Calcagno E, Guzzetti S, Canetta A, Fracasso C, Caccia S, et al.** (2010). Enhancement of cortical extracellular 5-HT by 5-HT_{1A} and 5-HT_{2C} receptor blockade restores the antidepressant-like effect of citalopram in non-responder mice. *Int J Neuropsychopharmacol*. 12(6):793-803.
- Cao BJ, Rodgers RJ** (1997). Dopamine D₄ receptor and anxiety: behavioural profiles of clozapine, L-745,870 and L-741,742 in the mouse plus-maze. *Eur J Pharmacol*. 335(2-3):117-25.
- Carroll BJ** (1982). Clinical applications of the dexamethasone suppression test for endogenous depression. *Pharmacopsychiatry*. 15(1):19-25.
- Casanovas JM, Lésourd M, Artigas F** (1997). The effect of the selective 5-HT_{1A} agonists alnespirone (S-20499) and 8-OH-DPAT on extracellular 5-hydroxytryptamine in different regions of rat brain. *Br J Pharmacol*. 122(4):733-41.
- Caspi A, Sugden K, Moffitt TE, Taylor A, Craig IW, et al.** (2003). Influence of life stress on depression: moderation by a polymorphism in the 5-HTT gene. *Science*. 301(5631):386-9.
- Cassano T, Gaetani S, Morgese MG, Macheda T, Laconca L, et al.** (2009). Monoaminergic changes in locus coeruleus and dorsal raphe nucleus following noradrenaline depletion. *Neurochem Res*. 34(8):1417-26.
- Castro E, Díaz A, Rodríguez-Gaztelumendi A, Del Olmo E, Pazos A** (2008). WAY100635 prevents the changes induced by fluoxetine upon the 5-HT_{1A} receptor functionality. *Neuropharmacology*. 55(8):1391-6.
- Castro ME, Diaz A, del Olmo E, Pazos A** (2003). Chronic fluoxetine induces opposite changes in G protein coupling at pre and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors in rat brain. *Neuropharmacology*. 44(1):93-101.
- Cecchi M, Khoshbouei H, Javors M, Morilak DA** (2002). Modulatory effects of norepinephrine in the lateral bed nucleus of the stria terminalis on behavioral and neuroendocrine responses to acute stress. *Neuroscience*. 112(1):13-21.

- Celada P, Puig M, Amargós-Bosch M, Adell A, Artigas F** (2004). The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. *J Psychiatry Neurosci.* 29(4):252-65.
- Chalmers DT, Watson SJ** (1991). Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain--a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. *Brain Res.* 561(1):51-60.
- Chang AS, Chang SM, Starnes DM, Schroeter S, Bauman AL, et al.** (1996). Cloning and expression of the mouse serotonin transporter. *Brain Res Mol Brain Res.* 43(1-2):185-92.
- Chang AS, Starnes DM, Chang SM** (1998). Possible existence of quaternary structure in the high-affinity serotonin transport complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 249(2):416-21.
- Chaput Y, de Montigny C, Blier P** (1986). Effects of a selective 5-HT reuptake blocker, citalopram, on the sensitivity of 5-HT autoreceptors: electrophysiological studies in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 333(4):342-8.
- Chee IS, Lee SW, Kim JL, Wang SK, Shin YO, et al.** (2001). 5-HT_{2A} receptor gene promoter polymorphism -1438A/G and bipolar disorder. *Psychiatr Genet.* 11(3):111-4.
- Chen Y, Penington NJ** (1996). Differential effects of protein kinase C activation on 5-HT_{1A} receptor coupling to Ca²⁺ and K⁺ currents in rat serotonergic neurones. *J Physiol*, 496 (Pt 1): 129-137.
- Chernoloz O, El Mansari M, Blier P** (2009). Electrophysiological studies in the rat brain on the basis for aripiprazole augmentation of antidepressants in major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 206(2):335-44.
- Choi MJ, Kang RH, Ham BJ, Jeong HY, Lee MS** (2005). Serotonin receptor 2A gene polymorphism (-1438A/G) and short-term treatment response to citalopram. *Neuropsychobiology.* 52(3):155-62.
- Christianson JP, Ragole T, Amat J, Greenwood BN, Strong PV, et al.** (2010). 5-hydroxytryptamine 2C receptors in the basolateral amygdala are involved in the expression of anxiety after uncontrollable traumatic stress. *Biol Psychiatry.* 67(4):339-45.
- Clark JA, Flick RB, Pai LY, Szalayova I, Key S, et al.** (2008). Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry.* 13(5):498-506.
- Clarke WP, Yocca FD, Maayani S** (1996). Lack of 5-hydroxytryptamine_{1A}-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 277(3): 1259-1266.
- Clement HW, Gamsa D, Wesemann W** (1992). Serotonin-norepinephrine interactions: a voltammetric study on the effect of serotonin receptor stimulation followed in the N. raphe dorsalis and the Locus coeruleus of the rat. *J Neural Transm Gen Sect.* 88(1):11-23.
- Cocco G, Agué C** (1977). Interactions between cardioactive drugs and antidepressants. *Eur J Clin Pharmacol.* 11(5):389-93.

- Cole JC, Burroughs GJ, Lavery CR, Sheriff NC, Sparham EA, et al.** (1995). Anxiolytic-like effects of yohimbine in the murine plus-maze: strain independence and evidence against alpha 2-adrenoceptor mediation. *Psychopharmacology (Berl)*. 118(4):425-36.
- Coppen A** (1967). The biochemistry of affective disorders. *Br J Psychiatry*. 113(504):1237-64.
- Cortés R, Soriano E, Pazos A, Probst A, Palacios JM** (1988). Autoradiography of antidepressant binding sites in the human brain: localization using [3H]imipramine and [3H]paroxetine. *Neuroscience*. 27(2):473-96.
- Costall B, Naylor RJ** (1995). Behavioural interactions between 5-hydroxytryptophan, neuroleptic agents and 5-HT receptor antagonists in modifying rodent responding to aversive situations. *Br J Pharmacol*. 116(7):2989-99.
- Cowen PJ** (1998). Back to the future: the neurobiology of major depression. *Psychol Med*. 28(2):253-5.
- Cremers TI, de Boer P, Liao Y, Bosker FJ, den Boer JA, et al.** (2000). Augmentation with a 5-HT(1A), but not a 5-HT(1B) receptor antagonist critically depends on the dose of citalopram. *Eur J Pharmacol*. 397(1):63-74.
- Cremers TI, Giorgetti M, Bosker FJ, Hogg S, Arnt J, et al.** (2004). Inactivation of 5-HT(2C) receptors potentiates consequences of serotonin reuptake blockade. *Neuropsychopharmacology*. 29(10):1782-9.
- Cremers TI, Rea K, Bosker FJ, Wikström HV, Hogg S, et al.** (2007). Augmentation of SSRI effects on serotonin by 5-HT_{2C} antagonists: mechanistic studies. *Neuropsychopharmacology*. 32(7):1550-7.
- Crespi F, Buda M, McRae-Degueurce A, Pujol JF** (1980). Alteration of tyrosine hydroxylase activity in the locus coeruleus after administration of p-chlorophenylalanine. *Brain Res*. 191(2):501-9.
- Cusin C, Serretti A, Zanardi R, Lattuada E, Rossini D, et al.** (2002). Influence of monoamine oxidase A and serotonin receptor 2A polymorphisms in SSRI antidepressant activity. *Int J Neuropsychopharmacol*. 5(1):27-35.
- Czéh B, Michaelis T, Watanabe T, Frahm J, de Biurrun G, et al.** (2001). Stress-induced changes in cerebral metabolites, hippocampal volume, and cell proliferation are prevented by antidepressant treatment with tianeptine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(22):12796-801.
- D'Amato RJ, Largent BL, Snowman AM, Snyder SH** (1987). Selective labeling of serotonin uptake sites in rat brain by [3H]citalopram contrasted to labeling of multiple sites by [3H]imipramine. *J Pharmacol Exp Ther*. 242(1):364-71.
- Darmani NA, Martin BR, Glennon RA** (1990). Withdrawal from chronic treatment with (+/-)-DOI causes super-sensitivity to 5-HT₂ receptor-induced head-twitch behaviour in mice. *Eur J Pharmacol*. 186(1):115-8.
- David DJ, Bourin M, Jegu G, Przybylski C, Jolliet P, et al.** (2003). Effects of acute treatment with paroxetine, citalopram and venlafaxine in vivo on noradrenaline and serotonin outflow: a microdialysis study in Swiss mice. *Br J Pharmacol*. 140(6): 1128-1136.

- David DJ, Samuels BA, Rainer Q, Wang JW, Marsteller D, et al.** (2009). Neurogenesis-dependent and -independent effects of fluoxetine in an animal model of anxiety/depression. *Neuron*. 62(4):479-93.
- Daws LC** (2009). Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol Ther*. 121(1):89-99.
- Dawson LA, Nguyen HQ** (2000). The role of 5-HT(1A) and 5-HT(1B/1D) receptors on the modulation of acute fluoxetine-induced changes in extracellular 5-HT: the mechanism of action of (+/-)pindolol. *Neuropharmacology*. 39(6):1044-52.
- Dawson LA, Nguyen HQ, Smith DL, Schechter LE** (2002). Effect of chronic fluoxetine and WAY-100635 treatment on serotonergic neurotransmission in the frontal cortex. *J Psychopharmacol*. 16(2):145-52.
- De Bellis MD, Geraciotti TD Jr, Altemus M, Kling MA** (1993). Cerebrospinal fluid monoamine metabolites in fluoxetine-treated patients with major depression and in healthy volunteers. *Biol Psychiatry*. 33(8-9):636-41.
- De Deurwaerdère P, Navailles S, Berg KA, Clarke WP, Spampinato U** (2004). Constitutive activity of the serotonin_{2C} receptor inhibits in vivo dopamine release in the rat striatum and nucleus accumbens. *J Neurosci*. 24(13):3235-41.
- De Deurwaerdère P, Spampinato U** (1999). Role of serotonin(2A) and serotonin(2B/2C) receptor subtypes in the control of accumbal and striatal dopamine release elicited in vivo by dorsal raphe nucleus electrical stimulation. *J Neurochem*. 73(3):1033-42.
- De Deurwaerdère P, Spampinato U** (2001). The nigrostriatal dopamine system: a neglected target for 5-HT_{2C} receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 22(10):502-4.
- De Montigny C, Aghajanian GK** (1978). Tricyclic antidepressants: long-term treatment increases responsiveness of rat forebrain neurons to serotonin. *Science*, 202(4374): 1303-1306.
- De Montigny C, Blier P, Caille G, Kouassi E** (1981). Pre- and postsynaptic effects of zimelidine and norzimelidine on the serotonergic system: single cell studies in the rat. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 290: 79-90.
- De Vry J, Schreiber R, Melon C, Dalmus M, Jentsch KR** (2004). 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol*. 14(6):487-95.
- Dean B** (2003). [³H]RX 821002 in human dorsolateral prefrontal cortex: no changes in postmortem tissue from subjects with schizophrenia. *Psychiatry Res*. 119(1-2):25-31.
- Delgado PL, Miller HL, Salomon RM, Licinio J, Krystal JH, et al.** (1999). Tryptophan-depletion challenge in depressed patients treated with desipramine or fluoxetine: implications for the role of serotonin in the mechanism of antidepressant action. *Biol Psychiatry*. 46(2):212-20.

- Dell'Osso B, Mundo E, Altamura AC** (2006). Quetiapine augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in treatment-resistant obsessive-compulsive disorder: a six-month follow-up case series. *CNS Spectr.* 11(11):879-83.
- Deltheil T, Guiard BP, Cerdan J, David DJ, Tanaka KF, et al.** (2008). Behavioral and serotonergic consequences of decreasing or increasing hippocampus brain-derived neurotrophic factor protein levels in mice. *Neuropharmacology.* 55(6):1006-14.
- Deng DR, Djalali S, Höltje M, Grosse G, Stroh T, et al.** (2007). Embryonic and postnatal development of the serotonergic raphe system and its target regions in 5-HT1A receptor deletion or overexpressing mouse mutants. *Neuroscience.* 147(2):388-402.
- Dhir A, Kulkarni SK** (2008). Risperidone, an atypical antipsychotic enhances the antidepressant-like effect of venlafaxine or fluoxetine: possible involvement of alpha-2 adrenergic receptors. *Neurosci Lett.* 445(1):83-8.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Di Mascio M, Esposito E** (2000). Preferential modulation of mesolimbic vs. nigrostriatal dopaminergic function by serotonin(2C/2B) receptor agonists: a combined in vivo electrophysiological and microdialysis study. *Synapse.* 35(1):53-61.
- Di Giovanni G, Di Matteo V, Pierucci M, Esposito E** (2008). Serotonin-dopamine interaction: electrophysiological evidence. *Prog Brain Res.* 172:45-71.
- Di Giovanni G, Esposito E, Di Matteo V** (2010). Role of serotonin in central dopamine dysfunction. *CNS Neurosci Ther.* 16(3):179-94.
- Di Mascio M, Di Giovanni G, Di Matteo V, Prisco S, Esposito E** (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors reduce the spontaneous activity of dopaminergic neurons in the ventral tegmental area. *Brain Res Bull.* 46(6):547-54.
- Di Matteo V, Cacchio M, Di Giulio C, Esposito E** (2002). Role of serotonin(2C) receptors in the control of brain dopaminergic function. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):727-34.
- Di Matteo V, Di Giovanni G, Di Mascio M, Esposito E** (1999). SB 242084, a selective serotonin2C receptor antagonist, increases dopaminergic transmission in the mesolimbic system. *Neuropharmacology.* 38(8):1195-205.
- Diaz SL, Maroteaux L** (2011). Implication of 5-HT(2B) receptors in the serotonin syndrome. *Neuropharmacology.* 61(3):495-502.
- Done CJ, Sharp T** (1992). Evidence that 5-HT2 receptor activation decreases noradrenaline release in rat hippocampus in vivo. *Br J Pharmacol.* 107(1):240-5.
- Dremencov E, El Mansari M, Blier P** (2007). Noradrenergic augmentation of escitalopram response by risperidone: electrophysiologic studies in the rat brain. *Biol Psychiatry* 61(5): 671-678.
- Dreshfield LJ, Wong DT, Perry KW, Engleman EA** (1996). Enhancement of fluoxetine-dependent increase of extracellular serotonin (5-HT) levels by (-)-pindolol, an antagonist at 5-HT1A receptors. *Neurochem Res.* 21(5):557-62.

- Drevets WC** (2003). Neuroimaging abnormalities in the amygdala in mood disorders. *Ann N Y Acad Sci.* 985:420-44.
- Drevets WC, Bogers W, Raichle ME** (2002). Functional anatomical correlates of antidepressant drug treatment assessed using PET measures of regional glucose metabolism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 12(6):527-44.
- Drevets WC, Frank E, Price JC, Kupfer DJ, Greer PJ, et al.** (2000). Serotonin type-1A receptor imaging in depression. *Nucl Med Biol.* 27(5):499-507.
- Drevets WC, Thase ME, Moses-Kolko EL, Price J, Frank E, et al.** (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl Med Biol.* 34(7):865-77.
- Duan H, Wang J** (2010). Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J Pharmacol Exp Ther.* 335(3):743-53.
- Dulawa SC, Holick KA, Gundersen B, Hen R** (2004). Effects of chronic fluoxetine in animal models of anxiety and depression. *Neuropsychopharmacology* 29(7): 1321-1330.
- Duman RS, Charney DS** (1999). Cell atrophy and loss in major depression. *Biol Psychiatry.* 45(9):1083-4.
- Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ** (1997). A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry.* 54(7):597-606.
- Duman RS, Malberg J, Nakagawa S, D'Sa C** (2001). Neuronal plasticity and survival in mood disorders. *Biol Psychiatry.* 48(8):732-9.
- Duman RS, Newton SS** (2007). Epigenetic marking and neuronal plasticity. *Biol Psychiatry.* 62(1):1-3.
- Duncan GE, Little KY, Kirkman JA, Kaldas RS, Stumpf WE, et al.** (1992). Autoradiographic characterization of [3H]imipramine and [3H]citalopram binding in rat and human brain: species differences and relationships to serotonin innervation patterns. *Brain Res.* 591(2):181-97.
- Durham LK, Webb SM, Milos PM, Clary CM, Seymour AB** (2004). The serotonin transporter polymorphism, 5HTTLPR, is associated with a faster response time to sertraline in an elderly population with major depressive disorder. *Psychopharmacology (Berl).* 174(4):525-9.
- Dursun SM, Handley SL** (1993). The effects of alpha 2-adrenoceptor antagonists on the inhibition of 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-2-aminopropane (DOI)-induced head shakes by 5-HT_{1A} receptor agonists in the mouse. *Br J Pharmacol.* 109(4):1046-52.
- Einat H, Clenet F, Shaldubina A, Belmaker RH, Bourin M** (2001). The antidepressant activity of inositol in the forced swim test involves 5-HT₂ receptors. *Behav Brain Res.* 118(1):77-83.
- El Mansari M, Blier P** (1996). Functional characterization of 5-HT_{1D} autoreceptors on the modulation of 5-HT release in guinea-pig mesencephalic raphe, hippocampus and frontal cortex. *Br J Pharmacol.* 118(3):681-9.

- El Mansari M, Sánchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N** (2005). Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 30(7):1269-77.
- El Mestikawy S, Riad M, Laporte AM, Verge D, et al.** (1990). Production of specific antirat 5-HT_{1A} receptor antibodies in rabbits injected with a synthetic peptide. *Neurosci Lett*, 118(2): 189-192.
- El Yacoubi M, Bouali S, Popa D, Naudon L, Leroux-Nicollet I, et al.** (2003). Behavioral, neurochemical, and electrophysiological characterization of a genetic mouse model of depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(10):6227-32.
- Engel K, Wang J** (2005). Interaction of organic cations with a newly identified plasma membrane monoamine transporter. *Mol Pharmacol*. 68(5):1397-407.
- Engel K, Zhou M, Wang J** (2004). Identification and characterization of a novel monoamine transporter in the human brain. *J Biol Chem*. 279(48):50042-9.
- Eriksson E** (2000). Antidepressant drugs: does it matter if they inhibit the reuptake of noradrenaline or serotonin? *Acta Psychiatr Scand Suppl*. 402:12-7.
- Fairchild G, Leitch MM, Ingram CD** (2003). Acute and chronic effects of corticosterone on 5-HT_{1A} receptor-mediated autoinhibition in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropharmacology*. 45(7):925-34.
- Fales CL, Barch DM, Rundle MM, Mintun MA, Mathews J, et al.** (2009). Antidepressant treatment normalizes hypoactivity in dorsolateral prefrontal cortex during emotional interference processing in major depression. *J Affect Disord*. 112(1-3):206-11.
- Fargin A, Raymond JR, Lohse MJ, Kobilka BK, et al.** (1988). The genomic clone G-21 which resembles a beta-adrenergic receptor sequence encodes the 5-HT_{1A} receptor. *Nature*, 335(6188): 358-360.
- Fernstrom JD, Wurtman RJ** (1972). Brain serotonin content: physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*. 178(59):414-6.
- Filip M, Bader M** (2009). Overview on 5-HT receptors and their role in physiology and pathology of the central nervous system. *Pharmacol Rep*. 61(5):761-77.
- Fink KB, Göthert M** (2007). 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. *Pharmacol Rev*. 59(4):360-417.
- Fischette CT, Nock B, Renner K** (1987). Effects of 5,7-dihydroxytryptamine on serotonin₁ and serotonin₂ receptors throughout the rat central nervous system using quantitative autoradiography. *Brain Res*. 421(1-2):263-79.
- Fitzgerald LW, Iyer G, Conklin DS, Krause CM, Marshall A, et al.** (1999). Messenger RNA editing of the human serotonin 5-HT_{2C} receptor. *Neuropsychopharmacology*. 21(2 Suppl):82S-90S.
- Flügge G** (1996). Alterations in the central nervous alpha 2-adrenoceptor system under chronic psychosocial stress. *Neuroscience*. 75(1):187-96.

- Fone KC, Shalders K, Fox ZD, Arthur R, Marsden CA** (1996). Increased 5-HT_{2C} receptor responsiveness occurs on rearing rats in social isolation. *Psychopharmacology (Berl)*. 123(4):346-52.
- Fornal CA, Martín FJ, Mendlin A, Metzler CW, Bjorvatn B, et al.** (1999). Pindolol increases extracellular 5-HT while inhibiting serotonergic neuronal activity. *Eur J Pharmacol*. 377(2-3):187-91.
- Francobandiera G** (2002). Quetiapine augmentation of sertraline in obsessive-compulsive disorder. *J Clin Psychiatry*. 63(11):1046-7.
- Frank MG, Stryker MP, Tecott LH** (2002). Sleep and sleep homeostasis in mice lacking the 5-HT_{2c} receptor. *Neuropsychopharmacology*. 27(5):869-73.
- Frankenburg FR** (1999). Choices in antipsychotic therapy in schizophrenia. *Harv Rev Psychiatry*. 6(5):241-9.
- Frazer A** (2001). Serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors: prediction of clinical effects from in vitro potencies. *J Clin Psychiatry*. 62 Suppl 12:16-23.
- French N** (1995). Alpha 2-adrenoceptors and I₂ sites in the mammalian central nervous system. *J Biol Chem*. 270(9):4334-40.
- Fuxe K, Dahlström A, Höistad M, Marcellino D, Jansson A, et al.** (2007). From the Golgi-Cajal mapping to the transmitter-based characterization of the neuronal networks leading to two modes of brain communication: Wiring and volume transmission. *Brain Res Rev*. 55:17–54.
- Garakani A, Martinez JM, Marcus S, Weaver J, Rickels K, et al.** (2008). A randomized, double-blind, and placebo-controlled trial of quetiapine augmentation of fluoxetine in major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol*. 23(5):269-75.
- Gardier AM, David DJ, Jegu G, Przybylski C, Jacquot C, et al.** (2003). Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT_{1B} receptor knockout mice. *J Neurochem*. 86(1):13-24.
- Gardier AM, Malagie I, Trillat AC, Jacquot C, Artigas F** (1996). Role of 5-HT_{1A} autoreceptors in the mechanism of action of serotonergic antidepressant drugs: recent findings from in vivo microdialysis studies. *Fundam Clin Pharmacol*. 10(1):16-27.
- Gartside SE, Clifford EM, Cowen PJ, Sharp T** (1999). Effects of (-)-tertatolol, (-)-penbutolol and (+/-) - pindolol in combination with paroxetine on presynaptic 5-HT function: an in vivo microdialysis and electrophysiological study. *Br J Pharmacol*. 127(1):145-52.
- Gehlert DR, Schober DA, Hemrick-Luecke SK, Krushinski J, Howbert JJ, et al.** (1995). Novel halogenated analogs of tomoxetine that are potent and selective inhibitors of norepinephrine uptake in brain. *Neurochem Int*. 26(1):47-52.
- Geretsegger C, Bitterlich W, Stelzig R, Stuppaeck C, Bondy B, et al.** (2008). Paroxetine with pindolol augmentation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study in depressed in-patients. *Eur Neuropsychopharmacol*. 18(2):141-6.

- Gether U, Andersen PH, Larsson OM, Schousboe A** (2006). Neurotransmitter transporters: molecular function of important drug targets. *Trends Pharmacol Sci* 27(7): 375-383.
- Ghanbari R, El Mansari M, Blier P** (2010). Electrophysiological effects of the co-administration of escitalopram and bupropion on rat serotonin and norepinephrine neurons. *J Psychopharmacol.* 24(1):39-50.
- Gilmor ML, Owens MJ, Nemeroff CB** (2002). Inhibition of norepinephrine uptake in patients with major depression treated with paroxetine. *Am J Psychiatry.* 159(10):1702-10.
- Giorgetti M, Tecott LH** (2004). Contributions of 5-HT(2C) receptors to multiple actions of central serotonin systems. *Eur J Pharmacol.* 488(1-3):1-9.
- Gobert A, Millan MJ** (1999). Modulation of dialysate levels of dopamine, noradrenaline, and serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely-moving rats by (-)-pindolol alone and in association with 5-HT reuptake inhibitors: comparative roles of beta-adrenergic, 5-HT1A, and 5-HT1B receptors. *Neuropsychopharmacology.* 21(2):268-84.
- Gobert A, Rivet JM, Cistarelli L, Millan MJ** (1997). Potentiation of the fluoxetine-induced increase in dialysate levels of serotonin (5-HT) in the frontal cortex of freely moving rats by combined blockade of 5-HT1A and 5-HT1B receptors with WAY 100,635 and GR 127,935. *J Neurochem.* 68(3):1159-63.
- Gobert A, Rivet JM, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Adhumeau-Auclair A, et al.** (2000). Serotonin(2C) receptors tonically suppress the activity of mesocortical dopaminergic and adrenergic, but not serotonergic, pathways: a combined dialysis and electrophysiological analysis in the rat. *Synapse.* 36(3):205-21.
- Goodwin GM** (1997). Neuropsychological and neuroimaging evidence for the involvement of the frontal lobes in depression. *J Psychopharmacol.* 11(2):115-22.
- Gorea E, Adrien J** (1988). Serotonergic regulation of noradrenergic coerulean neurons: electrophysiological evidence for the involvement of 5-HT2 receptors. *Eur J Pharmacol.* 154(3):285-91.
- Gorman JM, Korotzer A, Su G** (2002). Efficacy comparison of escitalopram and citalopram in the treatment of major depressive disorder: pooled analysis of placebo-controlled trials. *CNS Spectr.* 7(4 Suppl 1):40-4.
- Gould E, Tanapat P, McEwen BS, Flügge G, Fuchs E** (1998). Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(6):3168-71.
- Gould GG, Hensler JG, Burke TF, Benno RH, Onaivi ES, et al.** (2011). Density and function of central serotonin (5-HT) transporters, 5-HT1A and 5-HT2A receptors, and effects of their targeting on BTBR T+tf/J mouse social behavior. *J Neurochem.* 116(2):291-303.

- Grace AA, Bunney BS** (1983a). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--2. Action potential generating mechanisms and morphological correlates. *Neuroscience*. 10(2):317-31.
- Grace AA, Bunney BS** (1983b). Intracellular and extracellular electrophysiology of nigral dopaminergic neurons--3. Evidence for electrotonic coupling. *Neuroscience*. 10(2):333-48.
- Graeff FG, Guimarães FS, De Andrade TG, Deakin JF** (1996). Role of 5-HT in stress, anxiety, and depression. *Pharmacol Biochem Behav*. 54(1):129-41.
- Gravel P, de Montigny C** (1987). Noradrenergic denervation prevents sensitization of rat forebrain neurons to serotonin by tricyclic antidepressant treatment. *Synapse*, 1(3): 233-239.
- Greenberg BD, Tolliver TJ, Huang SJ, Li Q, Bengel D, et al.** (1999). Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets. *Am J Med Genet*. 88(1):83-7.
- Griebel G, Rodgers RJ, Perrault G, Sanger DJ** (1997). A comparative study of the effects of selective and non-selective 5-HT₂ receptor subtype antagonists in rat and mouse models of anxiety. *Neuropharmacology*. 36(6):793-802.
- Grønli J, Fiske E, Murison R, Bjorvatn B, Sørensen E, et al.** (2007). Extracellular levels of serotonin and GABA in the hippocampus after chronic mild stress in rats. A microdialysis study in an animal model of depression. *Behav Brain Res*. 181(1):42-51.
- Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, et al.** (2002). Serotonin_{1A} receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature*. 416(6879):396-400.
- Guiard BP, El Mansari M, Blier P** (2009). Prospect of a dopamine contribution in the next generation of antidepressant drugs: the triple reuptake inhibitors. *Curr Drug Targets*. 10(11):1069-84.
- Guiard BP, Mansari ME, Murphy DL, Blier P** (2011). Altered response to the selective serotonin reuptake inhibitor escitalopram in mice heterozygous for the serotonin transporter: an electrophysiological and neurochemical study. *Int J Neuropsychopharmacol*. 25:1-13. [Epub ahead of print]
- Guilloux JP, David DJ, Guiard BP, Chenu F, Reperant C, et al.** (2006). Blockade of 5-HT_{1A} receptors by (+/-)-pindolol potentiates cortical 5-HT outflow, but not antidepressant-like activity of paroxetine: microdialysis and behavioral approaches in 5-HT_{1A} receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 31(10): 2162-2172.
- Guilloux JP, David DJ, Xia L, Nguyen HT, Rainer Q, et al.** (2011). Characterization of 5-HT_{1A/1B}-/- mice: an animal model sensitive to anxiolytic treatments. *Neuropharmacology*. 61(3):478-88.
- Gundlach C, Alves SE, Clark JA, Pai LY, et al.** (2005). Estrogen receptor-beta regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biol Psychiatry*, 57(8): 938-942.

- Gundlah C, Hjorth S, Auerbach SB** (1997). Autoreceptor antagonists enhance the effect of the reuptake inhibitor citalopram on extracellular 5-HT: this effect persists after repeated citalopram treatment. *Neuropharmacology*. 36(4-5):475-82.
- Gurevich I, Englander MT, Adlersberg M, Siegal NB, Schmauss C** (2002). Modulation of serotonin 2C receptor editing by sustained changes in serotonergic neurotransmission. *J Neurosci*. 22(24):10529-32.
- Habert E, Graham D, Tahraoui L, Claustre Y, Langer SZ** (1985). Characterization of [3H]paroxetine binding to rat cortical membranes. *Eur J Pharmacol*. 118(1-2):107-14.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C** (1996). Effect of the alpha-2 adrenoceptor antagonist mirtazapine on the 5-hydroxytryptamine system in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 277(2):861-71.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C** (1997). Effects of long-term treatment with the alpha 2-adrenoceptor antagonist mirtazapine on 5-HT neurotransmission. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 355(1):20-9.
- Haddjeri N, Blier P, de Montigny C** (1998). Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT_{1A} receptors. *J Neurosci*. 18(23):10150-6.
- Haddjeri N, Lavoie N, Blier P** (2004). Electrophysiological evidence for the tonic activation of 5-HT_{1A} autoreceptors in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuropsychopharmacology*. 29(10):1800-6.
- Haj-Dahmane S, Hamon M, Lanfumey L** (1991). K⁺ channel and 5-hydroxytryptamine_{1A} autoreceptor interactions in the rat dorsal raphe nucleus: an in vitro electrophysiological study. *Neuroscience*, 41(2-3): 495-505.
- Hajós M, Hajós-Korcsok E, Sharp T** (1999). Role of the medial prefrontal cortex in 5-HT_{1A} receptor-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the rat. *Br J Pharmacol*. 126(8):1741-50.
- Hajós-Korcsok E, McQuade R, Sharp T** (1999). Influence of 5-HT_{1A} receptors on central noradrenergic activity: microdialysis studies using (+/-)-MDL 73005EF and its enantiomers. *Neuropharmacology*. 38(2):299-306.
- Hajós-Korcsok E, Robinson DD, Yu JH, Fitch CS, et al.** (2003). Rapid habituation of hippocampal serotonin and norepinephrine release and anxiety-related behaviors, but not plasma corticosterone levels, to repeated footshock stress in rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 74(3):609-16.
- Halberstadt AL, Lehmann-Masten VD, Geyer MA, Powell SB** (2011). Interactive effects of mGlu5 and 5-HT_{2A} receptors on locomotor activity in mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 215(1):81-92.
- Halberstadt AL, van der Heijden I, Ruderman MA, Risbrough VB, Gingrich JA, et al.** (2009). 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors exert opposing effects on locomotor activity in mice. *Neuropsychopharmacology*. 34(8):1958-67.
- Hall FS, Li XF, Randall-Thompson J, Sora I, Murphy DL, et al.** (2009). Cocaine-conditioned locomotion in dopamine transporter, norepinephrine transporter and 5-HT transporter knockout mice. *Neuroscience*. 162(4):870-80.
- Hamilton M** (1960). A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 23: 56-62.

- Hamon M** (1995). New perspectives in the serotonergic treatment for depression. *Therapie*. 50(6):505-9.
- Hansson AC, Rimondini R, Heilig M, Mathé AA, Sommer WH** (2011). Dissociation of antidepressant-like activity of escitalopram and nortriptyline on behaviour and hippocampal BDNF expression in female rats. *J Psychopharmacol*. [Epub ahead of print]
- Härfstrand A, Fuxe K, Cintra A, Agnati LF, Zini I, et al.** (1986). Glucocorticoid receptor immunoreactivity in monoaminergic neurons of rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(24):9779-83.
- Hasler G, Bonwetsch R, Giovacchini G, Toczek MT, Bagic A, et al.** (2007). 5-HT_{1A} receptor binding in temporal lobe epilepsy patients with and without major depression. *Biol Psychiatry*. 62(11):1258-64.
- He M, Sibille E, Benjamin D, Toth M, Shippenberg T** (2001). Differential effects of 5-HT_{1A} receptor deletion upon basal and fluoxetine-evoked 5-HT concentrations as revealed by in vivo microdialysis. *Brain Res*. 902(1):11-7.
- Heinz A, Jones DW, Mazzanti C, Goldman D, Ragan P, et al.** (2000). A relationship between serotonin transporter genotype and in vivo protein expression and alcohol neurotoxicity. *Biol Psychiatry*. 47(7):643-9.
- Heisler LK, Chu HM, Brennan TJ, Danao JA, et al.** (1998). Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(25): 15049-15054.
- Hensler JG** (2002). Differential regulation of 5-HT_{1A} receptor-G protein interactions in brain following chronic antidepressant administration. *Neuropsychopharmacology*. 26(5):565-73.
- Hensler JG** (2003). Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. *Life Sci*, 72(15): 1665-1682.
- Herrick-Davis K, Grinde E, Niswender CM** (1999). Serotonin 5-HT_{2C} receptor RNA editing alters receptor basal activity: implications for serotonergic signal transduction. *J Neurochem*. 73(4):1711-1717.
- Hervás I, Artigas F** (1998). Effect of fluoxetine on extracellular 5-hydroxytryptamine in rat brain. Role of 5-HT autoreceptors. *Eur J Pharmacol*. 358(1):9-18.
- Hervás I, Vilaró MT, Romero L, Scorza MC, Mengod G, et al.** (2001). Desensitization of 5-HT_{1A} autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology*. 24(1):11-20.
- Heslop KE, Curzon G** (1999). Effect of reserpine on behavioural responses to agonists at 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, and 5-HT_{2C} receptor subtypes. *Neuropharmacology*. 38(6):883-91.
- Hjorth S** (1996). (-)-Pindolol, but not buspirone, potentiates the citalopram-induced rise in extracellular 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol*. 303(3):183-6.

- Hjorth S, Auerbach SB** (1999). Autoreceptors remain functional after prolonged treatment with a serotonin reuptake inhibitor. *Brain Res.* 835(2):224-8.
- Hjorth S, Suchowski CS, Galloway MP** (1995). Evidence for 5-HT autoreceptor-mediated, nerve impulse-independent, control of 5-HT synthesis in the rat brain. *Synapse.* 19(3):170-6.
- Hjorth S, Westlin D, Bengtsson HJ** (1997). WAY100635-induced augmentation of the 5-HT-elevating action of citalopram: relative importance of the dose of the 5-HT_{1A} (auto)receptor blocker versus that of the 5-HT reuptake inhibitor. *Neuropharmacology.* 36(4-5):461-5.
- Hof PR, Young WG, Bloom FE, Belichenko PV, Celio MR** (2000). *Comparative Cytoarchitectonic Atlas of the C57BL/6 and 129/Sv Mouse Brains with CD ROM.* Elsevier: San Diego, CA.
- Holick KA, Lee DC, Hen R, Dulawa SC** (2008). Behavioral effects of chronic fluoxetine in BALB/cJ mice do not require adult hippocampal neurogenesis or the serotonin 1A receptor. *Neuropsychopharmacology* 33(2): 406-417.
- Hong CJ, Chen TJ, Yu YW, Tsai SJ** (2006). Response to fluoxetine and serotonin 1A receptor (C-1019G) polymorphism in Taiwan Chinese major depressive disorder. *Pharmacogenomics J.* 6(1):27-33.
- Hopwood SE, Stamford JA** (2001). Noradrenergic modulation of serotonin release in rat dorsal and median raphe nuclei via alpha(1) and alpha(2A) adrenoceptors. *Neuropharmacology.* 41(4):433-42.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR** (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):533-54.
- Hoyer D, Pazos A, Probst A, Palacios JM** (1986). Serotonin receptors in the human brain. I. Characterization and autoradiographic localization of 5-HT_{1A} recognition sites. Apparent absence of 5-HT_{1B} recognition sites. *Brain Res,* 376(1): 85-96.
- Hrdina PD, Foy B, Hepner A, Summers RJ** (1990). Antidepressant binding sites in brain: autoradiographic comparison of [3H]paroxetine and [3H]imipramine localization and relationship to serotonin transporter. *J Pharmacol Exp Ther.* 252(1):410-8.
- Hrdina PD, Vu TB** (1993). Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT₂ receptors in rat brain: an autoradiographic study. *Synapse.* 14(4):324-31.
- Huang M, Dai J, Meltzer HY** (2011). 5-HT(2A) and 5-HT(2C) receptor stimulation are differentially involved in the cortical dopamine efflux-Studied in 5-HT(2A) and 5-HT(2C) genetic mutant mice. *Eur J Pharmacol.* 652(1-3):40-5.
- Huang M, Ichiwaka J, Li Z, Dai J, Meltzer HY** (2006). Augmentation by citalopram of risperidone-induced monoamine release in rat prefrontal cortex. *Psychopharmacology (Berl).* 185(3):274-81.
- Huezo-Diaz P, Uher R, Smith R, Rietschel M, Henigsberg N, et al.** (2009). Moderation of antidepressant response by the serotonin transporter gene. *Br J Psychiatry.* 195(1):30-8.
- Hughes FB, Brodie BB** (1959). The mechanism of serotonin and catecholamine uptake by platelets. *J Pharmacol Exp Ther.* 127:96-102.

- Hughes ZA, Stanford SC** (1996). Increased noradrenaline efflux induced by local infusion of fluoxetine in the rat frontal cortex. *Eur J Pharmacol* 317(1): 83-90.
- Hughes ZA, Stanford SC** (1998). Evidence from microdialysis and synaptosomal studies of rat cortex for noradrenaline uptake sites with different sensitivities to SSRIs. *Br J Pharmacol* 124(6): 1141-1148.
- Hyttel J** (1994). Pharmacological characterization of selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). *Int Clin Psychopharmacol.* 9 Suppl 1:19-26.
- Hyttel J, Bøgesø KP, Perregaard J, Sánchez C** (1992). The pharmacological effect of citalopram residues in the (S)-(+)-enantiomer. *J Neural Transm Gen Sect.* 88(2):157-60.
- Hyttel J, Larsen JJ** (1985). Neurochemical profile of Lu 19-005, a potent inhibitor of uptake of dopamine, noradrenaline, and serotonin. *J Neurochem.* 44(5):1615-22.
- Invernizzi R, Belli S, Samanin R** (1992). Citalopram's ability to increase the extracellular concentrations of serotonin in the dorsal raphe prevents the drug's effect in the frontal cortex. *Brain Res.* 584(1-2):322-4.
- Invernizzi R, Bramante M, Samanin R** (1994). Chronic treatment with citalopram facilitates the effect of a challenge dose on cortical serotonin output: role of presynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Eur J Pharmacol.* 260(2-3):243-6.
- Isaac M** (1999). Where are we going with SSRIs? *Eur Neuropsychopharmacol.* 9(Suppl. 3): S101–S106.
- Ito H, Nyberg S, Halldin C, Lundkvist C, Farde L** (1998). PET imaging of central 5-HT_{2A} receptors with carbon-11-MDL 100,907. *J Nucl Med.* 39(1):208-14.
- Iwamoto K, Bundo M, Kato T** (2009). Serotonin receptor 2C and mental disorders: genetic, expression and RNA editing studies. *RNA Biol.* 6(3):248-53.
- Iwamoto K, Kato T** (2003). RNA editing of serotonin 2C receptor in human postmortem brains of major mental disorders. *Neurosci Lett.* 346(3):169-72.
- Jackisch R, Haaf A, Jeltsch H, Lazarus C, Kelche C, et al.** (1999). Modulation of 5-hydroxytryptamine release in hippocampal slices of rats: effects of fimbria-fornix lesions on 5-HT_{1B}-autoreceptor and alpha₂-heteroreceptor function. *Brain Res Bull.* 48(1):49-59.
- Jacobs BL, van Praag H, Gage FH** (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry.* 5(3):262-9.
- Jacobsen KX, Vanderluit JL, Slack RS, Albert PR** (2008). HES1 regulates 5-HT_{1A} receptor gene transcription at a functional polymorphism: essential role in developmental expression. *Mol Cell Neurosci.* 38(3):349-58.
- Joffe P, Larsen FS, Pedersen V, Ring-Larsen H, Aaes-Jørgensen T, et al.** (1998). Single-dose pharmacokinetics of citalopram in patients with moderate renal insufficiency or hepatic cirrhosis compared with healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol.* 54(3):237-42.

- Jolas T, Haj-Dahmane S, Lanfumey L, Fattaccini CM, et al.** (1993). (-)Tertatolol is a potent antagonist at pre- and postsynaptic serotonin 5-HT_{1A} receptors in the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 347(5): 453-463.
- Jordan S, Kramer GL, Zukas PK, Moeller M, Petty F** (1994). In vivo biogenic amine efflux in medial prefrontal cortex with imipramine, fluoxetine, and fluvoxamine. *Synapse* 18(4): 294-297.
- Joubert AF, Stein DJ** (1999). Citalopram and anxiety disorders. *Rev Contemp Pharmacother*. 10:79–131.
- Judge SJ, Gartside SE** (2006). Firing of 5-HT neurones in the dorsal and median raphe nucleus in vitro shows differential alpha₁-adrenoceptor and 5-HT_{1A} receptor modulation. *Neurochem Int*. 48(2):100-7.
- Juhász G, Zsombok T, Laszik A, Jakus R, Faludi G, et al.** (2003). Despite the general correlation of the serotonin transporter gene regulatory region polymorphism (5-HTTLPR) and platelet serotonin concentration, lower platelet serotonin concentration in migraine patients is independent of the 5-HTTLPR variants. *Neurosci Lett*. 350(1):56-60.
- Karg K, Burmeister M, Shedden K, Sen S** (2011). The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: evidence of genetic moderation. *Arch Gen Psychiatry*. 68(5):444-54.
- Kasamo K, Blier P, De Montigny C** (1996). Blockade of the serotonin and norepinephrine uptake processes by duloxetine: in vitro and in vivo studies in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 277(1):278-86.
- Katayama J, Yakushiji T, Akaike N** (1997). Characterization of the K⁺ current mediated by 5-HT_{1A} receptor in the acutely dissociated rat dorsal raphe neurons. *Brain Res*, 745(1-2): 283-292.
- Kato M, Fukuda T, Wakeno M, Okugawa G, Takekita Y, et al.** (2009). Effect of 5-HT_{1A} gene polymorphisms on antidepressant response in major depressive disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 150B(1):115-23.
- Kayser V, Elfassi IE, Aubel B, Melfort M, Julius D, et al.** (2007). Mechanical, thermal and formalin-induced nociception is differentially altered in 5-HT_{1A}^{-/-}, 5-HT_{1B}^{-/-}, 5-HT_{2A}^{-/-}, 5-HT_{3A}^{-/-} and 5-HTT^{-/-} knock-out male mice. *Pain*. 130(3):235-48.
- Keefe RS, Silva SG, Perkins DO, Lieberman JA** (1999). The effects of atypical antipsychotic drugs on neurocognitive impairment in schizophrenia: a review and meta-analysis. *Schizophr Bull*. 25(2):201-22.
- Keitner GI, Garlow SJ, Ryan CE, Ninan PT, Solomon DA, et al.** (2009). A randomized, placebo-controlled trial of risperidone augmentation for patients with difficult-to-treat unipolar, non-psychotic major depression. *J Psychiatr Res*. 43(3):205-14.
- Kennett GA, Lightowler S, de Biasi V, Stevens NC, Wood MD, et al.** (1994). Effect of chronic administration of selective 5-hydroxytryptamine and noradrenaline uptake inhibitors on a putative index of 5-HT_{2C/2B} receptor function. *Neuropharmacology*. 33(12):1581-8.

- Kessler RC** (2003). Epidemiology of women and depression. *J Affect Disord*, 74(1): 5-13.
- Khawaja X** (1995). Quantitative autoradiographic characterisation of the binding of [3H]WAY-100635, a selective 5-HT_{1A} receptor antagonist. *Brain Res*, 673(2): 217-225.
- Kim DK, Lim SW, Lee S, Sohn SE, Kim S, et al.** (2000). Serotonin transporter gene polymorphism and antidepressant response. *Neuroreport*. 11(1):215-9.
- Knapp DJ, Overstreet DH, Moy SS, Breese GR** (2004). SB242084, flumazenil, and CRA1000 block ethanol withdrawal-induced anxiety in rats. *Alcohol*. 32(2):101-11.
- Knobelman DA, Hen R, Lucki I** (2001). Genetic regulation of extracellular serotonin by 5-hydroxytryptamine(1A) and 5-hydroxytryptamine(1B) autoreceptors in different brain regions of the mouse. *J Pharmacol Exp Ther*. 298(3):1083-91.
- Kobayashi K, Ikeda Y, Haneda E, Suzuki H** (2008). Chronic fluoxetine bidirectionally modulates potentiating effects of serotonin on the hippocampal mossy fiber synaptic transmission. *J Neurosci* 28(24): 6272-6280.
- Kobilka BK, Frielle T, Collins S, Yang-Feng T, et al.** (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*, 329(6134): 75-79.
- Koch S, Hemrick-Luecke SK, Thompson LK, Evans DC, Threlkeld PG, et al.** (2003). Comparison of effects of dual transporter inhibitors on monoamine transporters and extracellular levels in rats. *Neuropharmacology*. 45(7):935-44.
- Koch S, Perry KW, Nelson DL, Conway RG, Threlkeld PG, et al.** (2002). R-fluoxetine increases extracellular DA, NE, as well as 5-HT in rat prefrontal cortex and hypothalamus: an in vivo microdialysis and receptor binding study. *Neuropsychopharmacology* 27(6): 949-959.
- Koek W, Patoiseau JF, Assié MB, Cosi C, Kleven MS, et al.** (1998). F 11440, a potent, selective, high efficacy 5-HT_{1A} receptor agonist with marked anxiolytic and antidepressant potential. *J Pharmacol Exp Ther*. 287(1):266-83.
- Kovacević T, Skelin I, Diksic M** (2010). Chronic fluoxetine treatment has a larger effect on the density of a serotonin transporter in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat model of depression than in normal rats. *Synapse*. 64(3):231-40.
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH** (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci*, 16(6): 2027-2033.
- Kuroda Y, Mikuni M, Ogawa T, Takahashi K** (1992). Effect of ACTH, adrenalectomy and the combination treatment on the density of 5-HT₂ receptor binding sites in neocortex of rat forebrain and 5-HT₂ receptor-mediated wet-dog shake behaviors. *Psychopharmacology*. 108(1-2):27-32.
- Kusserow H, Davies B, Hörtnagl H, Voigt I, Stroh T, et al.** (2004). Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin 1A receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 129(1-2):104-16.

- La Marca S, Dunn RW** (1994). The alpha-2 antagonists idazoxan and rauwolscine but not yohimbine or piperoxan are anxiolytic in the Vogel lick-shock conflict paradigm following intravenous administration. *Life Sci.* 54(10):PL179-84.
- Landolt HP, Wehrle R** (2009). Antagonism of serotonergic 5-HT_{2A/2C} receptors: mutual improvement of sleep, cognition and mood?. *Eur J Neurosci.* 29(9):1795-809.
- Laporte AM, Lima L, Gozlan H, Hamon M** (1994). Selective in vivo labelling of brain 5-HT_{1A} receptors by [3H]WAY 100635 in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 271(2-3): 505-514.
- Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, et al.** (2000). Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology*, 39(1): 110-122.
- Le Poul E, Laaris N, Doucet E, Laporte AM, Hamon M, et al.** (1995). Early desensitization of somato-dendritic 5-HT_{1A} autoreceptors in rats treated with fluoxetine or paroxetine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 352(2):141-8.
- Leggio GM, Cathala A, Moison D, Cunningham KA, Piazza PV, et al.** (2011). Serotonin_{2C} receptors in the medial prefrontal cortex facilitate cocaine-induced dopamine release in the rat nucleus accumbens. *Neuropharmacology.* 56(2):507-13.
- Lemonde S, Du L, Bakish D, Hrdina P, Albert PR** (2004). Association of the C(-1019)G 5-HT_{1A} functional promoter polymorphism with antidepressant response. *Int J Neuropsychopharmacol.* 7(4):501-6.
- Lesch KP** (2001). Serotonergic gene expression and depression: implications for developing novel antidepressants. *J Affect Disord.* 62(1-2):57-76.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, et al.** (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science.* 274(5292):1527-31.
- Lesch KP, Wolozin BL, Estler HC, Murphy DL, Riederer P** (1993). Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. *J Neural Transm Gen Sect.* 91(1):67-72.
- Levin GM, Bowles TM, Ehret MJ, Langaee T, Tan JY, et al.** (2007). Assessment of human serotonin 1A receptor polymorphisms and SSRI responsiveness. *Mol Diagn Ther.* 11(3):155-60.
- Leysen JE** (2004). 5-HT₂ receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3(1):11-26.
- Li Q, Muma NA, Battaglia G, Van de Kar LD** (1997). Fluoxetine gradually increases [125I]DOI-labelled 5-HT_{2A/2C} receptors in the hypothalamus without changing the levels of Gq- and G11-proteins. *Brain Res.* 775(1-2):225-8.
- Liang Y, Shaw AM, Boules M, Briody S, Robinson J, et al.** (2008). Antidepressant-like pharmacological profile of a novel triple reuptake inhibitor, (1S,2S)-3-(methylamino)-2-(naphthalen-2-yl)-1-phenylpropan-1-ol (PRC200-SS). *J Pharmacol Exp Ther.* 327(2):573-83.

- Lin E, Chen PS, Chang HH, Gean PW, Tsai HC, et al.** (2009). Interaction of serotonin-related genes affects short-term antidepressant response in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 33(7):1167-72.
- Liprando LA, Miner LH, Blakely RD, Lewis DA, Sesack SR** (2004). Ultrastructural interactions between terminals expressing the norepinephrine transporter and dopamine neurons in the rat and monkey ventral tegmental area. *Synapse*. 52:233–244.
- Little KY, McLaughlin DP, Zhang L, Livermore CS, Dalack GW, et al.** (1998). Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels. *Am J Psychiatry*. 155(2):207-13.
- López-Figueroa AL, Norton CS, López-Figueroa MO, Armellini-Dodel D, et al.** (2004). Serotonin 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, and 5-HT_{2A} receptor mRNA expression in subjects with major depression, bipolar disorder, and schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 55(3):225-33.
- López-Giménez JF, Mengod G, Palacios JM, Vilaró MT** (1997). Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [³H]MDL 100,907. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 356(4):446-54.
- Lowther S, De Paermentier F, Cheetham SC, Crompton MR, Katona CL, et al.** (1997). 5-HT_{1A} receptor binding sites in post-mortem brain samples from depressed suicides and controls. *J Affect Disord*. 42(2-3):199-207.
- Lucas G, Spampinato U** (2000). Role of striatal serotonin_{2A} and serotonin_{2C} receptor subtypes in the control of in vivo dopamine outflow in the rat striatum. *J Neurochem*. 74(2):693-701.
- Lundberg J, Borg J, Halldin C, Farde L** (2007). A PET study on regional coexpression of 5-HT_{1A} receptors and 5-HTT in the human brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 195(3):425-33.
- Lundkvist C, Halldin C, Ginovart N, Nyberg S, Swahn CG, et al.** (1996). [¹¹C]MDL 100907, a radioligand for selective imaging of 5-HT_{2A} receptors with positron emission tomography. *Life Sci*. 58(10):PL 187-92.
- Maes M, Libbrecht I, van Hunsel F, Campens D, Meltzer HY** (1999). Pindolol and mianserin augment the antidepressant activity of fluoxetine in hospitalized major depressed patients, including those with treatment resistance. *J Clin Psychopharmacol*. 19(2):177-82.
- Maes M, Westenberg H, Vandoolaeghe E, Demedts P, Wauters A, et al.** (1997). Effects of trazodone and fluoxetine in the treatment of major depression: therapeutic pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions through formation of meta-chlorophenylpiperazine. *J Clin Psychopharmacol*. 17(5):358-64.
- Mailliet F, Qi H, Rocher C, Spedding M, Svenningsson P, et al.** (2008). Protection of stress-induced impairment of hippocampal/prefrontal LTP through blockade of glucocorticoid receptors: implication of MEK signaling. *Exp Neurol*. 211(2):593-6.

- Malagié I, David DJ, Jolliet P, Hen R, Bourin M, et al.** (2002). Improved efficacy of fluoxetine in increasing hippocampal 5-hydroxytryptamine outflow in 5-HT(1B) receptor knock-out mice. *Eur J Pharmacol.* 443(1-3):99-104.
- Malagié I, Deslandes A, Gardier AM** (2000). Effects of acute and chronic tianeptine administration on serotonin outflow in rats: comparison with paroxetine by using in vivo microdialysis. *Eur J Pharmacol.* 403(1-2):55-65.
- Malagié I, Trillat AC, Bourin M, Jacquot C, Hen R, et al.** (2001). 5-HT1B Autoreceptors limit the effects of selective serotonin re-uptake inhibitors in mouse hippocampus and frontal cortex. *J Neurochem.* 76(3):865-71.
- Malagié I, Trillat AC, Douvier E, Anmella MC, Dessalles MC, et al.** (1996). Regional differences in the effect of the combined treatment of WAY 100635 and fluoxetine: an in vivo microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 354(6):785-90.
- Malagié I, Trillat AC, Jacquot C, Gardier AM** (1995). Effects of acute fluoxetine on extracellular serotonin levels in the raphe: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol.* 286(2):213-7.
- Malgouris C, Flamand F, Doble A** (1993). Autoradiographic studies of RP 62203, a potent 5-HT2 receptor antagonist. In vitro and ex vivo selectivity profile. *Eur J Pharmacol.* 233(1):29-35.
- Mann JJ, Huang YY, Underwood MD, Kassir SA, Oppenheim S, et al.** (2000). A serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and prefrontal cortical binding in major depression and suicide. *Arch Gen Psychiatry.* 57(8):729-38.
- Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, et al.** (2001). Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT(1a) receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. *J Neurosci.* 21(6): 2178-2185.
- Marek GJ, Martin-Ruiz R, Abo A, Artigas F** (2005). The selective 5-HT2A receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine. *Neuropsychopharmacology.* 30(12):2205-15.
- Margoob MA, Mushtaq D, Murtza I, Mushtaq H, Ali A** (2008). Serotonin transporter gene polymorphism and treatment response to serotonin reuptake inhibitor (escitalopram) in depression: An open pilot study. *Indian J Psychiatry.* 50(1):47-50.
- Martin JR, Ballard TM, Higgins GA** (2002). Influence of the 5-HT2C receptor antagonist, SB-242084, in tests of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 71(4):615-25.
- Martín-Ruiz R, Puig MV, Celada P, Shapiro DA, Roth BL, et al.** (2001). Control of serotonergic function in medial prefrontal cortex by serotonin-2A receptors through a glutamate-dependent mechanism. *J Neurosci.* 21(24):9856-66.
- Maryanoff BE, McComsey DF, Gardocki JF, Shank RP, Costanzo MJ, et al.** (1987). Pyrroloisoquinoline antidepressants. 2. In-depth exploration of structure-activity relationships. *J Med Chem.* 30(8):1433-54.

- Massou JM, Trichard C, Attar-Levy D, Feline A, Corruble E, et al.** (1997). Frontal 5-HT_{2A} receptors studied in depressive patients during chronic treatment by selective serotonin reuptake inhibitors. *Psychopharmacology (Berl)*. 133(1):99-101.
- Matthews JD, Siefert C, Dording C, Denninger JW, Park L, et al.** (2009). An open study of aripiprazole and escitalopram for psychotic major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol*. 29(1):73-6.
- McEwen BS** (1999). Permanence of brain sex differences and structural plasticity of the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(13):7128-30.
- McMahon FJ, Buervenich S, Charney D, Lipsky R, Rush AJ, et al.** (2006). Variation in the gene encoding the serotonin 2A receptor is associated with outcome of antidepressant treatment. *Am J Hum Genet*. 78(5):804-14.
- McRae-Degueurce A, Berod A, Mermet A, Keller A, Chouvet G, et al.** (1982). Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat locus coeruleus: evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res*. 235(2):285-301.
- Mehta M, Ahmed Z, Fernando SS, Cano-Sanchez P, Adayev T, et al.** (2007). Plasticity of 5-HT 1A receptor-mediated signaling during early postnatal brain development. *J Neurochem*. 101(4):918-28.
- Meltzer CC, Price JC, Mathis CA, Butters MA, Ziolkowski SK, et al.** (2004). Serotonin 1A receptor binding and treatment response in late-life depression. *Neuropsychopharmacology*. 29(12):2258-65.
- Miguelé C, Fernandez-Aedo I, Torrecilla M, Grandoso L, Ugedo L** (2009). $\alpha(2)$ -Adrenoceptors mediate the acute inhibitory effect of fluoxetine on locus coeruleus noradrenergic neurons. *Neuropharmacology* 56(6-7): 1068-1073.
- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Dekeyne A, Newman-Tancredi A, et al.** (2003a). The novel melatonin agonist agomelatine (S20098) is an antagonist at 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors, blockade of which enhances the activity of frontocortical dopaminergic and adrenergic pathways. *J Pharmacol Exp Ther*. 306(3):954-64.
- Millan MJ, Gobert A, Lejeune F, Newman-Tancredi A, Rivet JM, et al.** (2001). S33005, a novel ligand at both serotonin and norepinephrine transporters: I. Receptor binding, electrophysiological, and neurochemical profile in comparison with venlafaxine, reboxetine, citalopram, and clomipramine. *J Pharmacol Exp Ther* 298(2): 565-580.
- Millan MJ, Gobert A, Rivet JM, Adhumeau-Auclair A, Cussac D, et al.** (2000a). Mirtazapine enhances frontocortical dopaminergic and corticolimbic adrenergic, but not serotonergic, transmission by blockade of $\alpha(2)$ -adrenergic and serotonin_{2C} receptors: a comparison with citalopram. *Eur J Neurosci*. 12(3):1079-95.

- Millan MJ, Newman-Tancredi A, Audinot V, Cussac D, Lejeune F, et al.** (2000b). Agonist and antagonist actions of yohimbine as compared to fluparoxan at alpha(2)-adrenergic receptors (AR)s, serotonin (5-HT)(1A), 5-HT(1B), 5-HT(1D) and dopamine D(2) and D(3) receptors. Significance for the modulation of frontocortical monoaminergic transmission and depressive states. *Synapse*. 35(2):79-95.
- Millan MJ, Veiga S, Girardon S, Brocco M** (2003b). Blockade of serotonin 5-HT1B and 5-HT2A receptors suppresses the induction of locomotor activity by 5-HT reuptake inhibitors, citalopram and fluvoxamine, in NMRI mice exposed to a novel environment: a comparison to other 5-HT receptor subtypes. *Psychopharmacology (Berl)*. 168(4):397-409.
- Miner LH, Schroeter S, Blakely RD, Sesack SR** (2003). Ultrastructural localization of the norepinephrine transporter in superficial and deep layers of the rat prelimbic prefrontal cortex and its spatial relationship to probable dopamine terminals. *J Comp Neurol*. 466:478–494.
- Minov C, Baghai TC, Schüle C, Zwanzger P, Schwarz MJ, et al.** (2001). Serotonin-2A-receptor and -transporter polymorphisms: lack of association in patients with major depression. *Neurosci Lett*. 303(2):119-22.
- Mintun MA, Sheline YI, Moerlein SM, Vlassenko AG, et al.** (2004). Decreased hippocampal 5-HT2A receptor binding in major depressive disorder: in vivo measurement with [18F]altanserin positron emission tomography. *Biol Psychiatry*. 55(3):217-24.
- Miquel MC, Doucet E, Boni C, El Mestikawy S, et al.** (1991). Central serotonin1A receptors: Respective distributions of encoding mRNA, receptor protein and binding sites by in situ hybridization histochemistry, radioimmunohistochemistry and autoradiographic mapping in the rat brain. *Neurochem. Int.*, (19): 453–465.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T** (2003). Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 119(3):887-97.
- Mnie-Filali O, El Mansari M, Scarna H, Zimmer L, Sánchez C, Haddjeri N** (2007a). Escitalopram: a selective inhibitor and allosteric modulator of the serotonin transporter. *Encephale*. 33(6):965-72.
- Mnie-Filali O, Faure C, Mansari ME, Lambás-Señas L, Bérod A, et al.** (2007b). R-citalopram prevents the neuronal adaptive changes induced by escitalopram. *Neuroreport*. 18(15):1553-6.
- Molteni R, Cattaneo A, Calabrese F, Macchi F, Olivier JD, et al.** (2009). Reduced function of the serotonin transporter is associated with decreased expression of BDNF in rodents as well as in humans. *Neurobiol Dis*. 37(3):747-55.
- Mongeau R, Blier P, de Montigny C** (1993). In vivo electrophysiological evidence for tonic activation by endogenous noradrenaline of alpha 2-adrenoceptors on 5-hydroxytryptamine terminals in the rat hippocampus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 347(3):266-72.

- Mongeau R, De Montigny C, Blier P** (1994). Effect of long-term administration of antidepressant drugs on the 5-HT₃ receptors that enhance the electrically evoked release of [3H]noradrenaline in the rat hippocampus. *Eur J Pharmacol* 271(1): 121-129.
- Montgomery S, Hansen T, Kasper S** (2011). Efficacy of escitalopram compared to citalopram: a meta-analysis. *Int J Neuropsychopharmacol*. 14(2):261-8.
- Montgomery SA, Loft H, Sánchez C, Reines EH, Papp M** (2001). Escitalopram (S-enantiomer of citalopram): clinical efficacy and onset of action predicted from a rat model. *Pharmacol Toxicol*. 88(5):282-6.
- Moreno FA, Gelenberg AJ, Bachar K, Delgado PL** (1997). Pindolol augmentation of treatment-resistant depressed patients. *J Clin Psychiatry*. 58(10):437-9.
- Morilak DA, Ciaranello RD** (1993). 5-HT₂ receptor immunoreactivity on cholinergic neurons of the pontomesencephalic tegmentum shown by double immunofluorescence. *Brain Res*. 627(1):49-54.
- Mørk A, Kreilgaard M, Sánchez C** (2003). The R-enantiomer of citalopram counteracts escitalopram-induced increase in extracellular 5-HT in the frontal cortex of freely moving rats. *Neuropharmacology*. 45(2):167-73.
- Moser PC, Sanger DJ** (1999). 5-HT_{1A} receptor antagonists neither potentiate nor inhibit the effects of fluoxetine and befloxacitane in the forced swim test in rats. *Eur J Pharmacol*. 372(2):127-34.
- Moses-Kolko EL, Wisner KL, Price JC, Berga SL, Drevets WC, et al.** (2008). Serotonin 1A receptor reductions in postpartum depression: a positron emission tomography study. *Fertil Steril*. 89(3):685-92.
- Motta V, Maisonnète S, Morato S, Castrechini P, Brandão ML** (1992). Effects of blockade of 5-HT₂ receptors and activation of 5-HT_{1A} receptors on the exploratory activity of rats in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl)*. 107(1):135-9.
- Murphy GM Jr, Hollander SB, Rodrigues HE, Kremer C, Schatzberg AF** (2009). Effects of the serotonin transporter gene promoter polymorphism on mirtazapine and paroxetine efficacy and adverse events in geriatric major depression. *Arch Gen Psychiatry*. 61(11):1163-9.
- Nakada S** (2000). Effects of (+/-)-pindolol over increased extracellular 5-HT level induced by fluvoxamine: regional difference in effect among the raphe, dorsal hippocampus and prefrontal cortex as measured by in vivo microdialysis technique. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 20(2):51-60.
- Navailles S, Moison D, Cunningham KA, Spampinato U** (2008). Differential regulation of the mesoaccumbens dopamine circuit by serotonin_{2C} receptors in the ventral tegmental area and the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study with cocaine. *Neuropsychopharmacology*. 33(2):237-46.
- Nelson AM, Larson GA, Zahniser NR** (2009). Low or high cocaine responding rats differ in striatal extracellular dopamine levels and dopamine transporter number. *J Pharmacol Exp Ther*. 331(3):985-97.

- Nestler EJ, Hyman SE** (2010). Animal models of neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci.* 13(10):1161-9.
- Neumeister A, Wood S, Bonne O, Nugent AC, Luckenbaugh DA, et al.** (2005). Reduced hippocampal volume in unmedicated, remitted patients with major depression versus control subjects. *Biol Psychiatry.* 57(8):935-7.
- Newman ME, Shalom G, Ran A, Gur E, Van de Kar LD** (2004). Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} autoreceptors: regional differences and effects of WAY-100635. *Eur J Pharmacol.* 486(1):25-30.
- Ni YG, Miledi R** (1997). Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(5):2036-40.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS** (1995). Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci.* 15(11):7539-47.
- Nicholas AP, Pieribone VA, Hökfelt T** (1993). Cellular localization of messenger RNA for beta-1 and beta-2 adrenergic receptors in rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience.* 56(4):1023-39.
- Niswender CM, Copeland SC, Herrick-Davis K, Emeson RB, Sanders-Bush E** (1999). RNA editing of the human serotonin 5-hydroxytryptamine 2C receptor silences constitutive activity. *J Biol Chem.* 274(14):9472-8.
- Noro M, Antonijevic I, Forray C, Kasper S, Kocabas NA, et al.** (2010). 5HT_{1A} and 5HT_{2A} receptor genes in treatment response phenotypes in major depressive disorder. *Int Clin Psychopharmacol.* 25(4):228-31.
- Nukina I, Glavin GB, LaBella FS** (1987). Acute cold-restraint stress affects alpha 2-adrenoceptors in specific brain regions of the rat. *Brain Res.* 401(1):30-3.
- Numazawa R, Yoshioka M, Matsumoto M, Togashi H, Kemmotsu O, et al.** (1995). Pharmacological characterization of alpha 2-adrenoceptor regulated serotonin release in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 192(3):161-4.
- Ohno Y** (2010). New insight into the therapeutic role of 5-HT_{1A} receptors in central nervous system disorders. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 10(2):148-57.
- Oleskevich S** (1995). G alpha o1 decapeptide modulates the hippocampal 5-HT_{1A} potassium current. *J Neurophysiol.* 74(5): 2189-2193.
- Olivier B, Soudijn W, van Wijngaarden I** (2000). Serotonin, dopamine and norepinephrine transporters in the central nervous system and their inhibitors. *Prog Drug Res.* 54:59-119.
- Ortega JE, Fernández-Pastor B, Callado LF, Meana JJ** (2010). In vivo potentiation of reboxetine and citalopram effect on extracellular noradrenaline in rat brain by α ₂-adrenoceptor antagonism. *Eur Neuropsychopharmacol.* 20(11):813-22.
- Ostroff RB, Nelson JC** (1999). Risperidone augmentation of selective serotonin reuptake inhibitors in major depression. *J Clin Psychiatry.* 60(4):256-9.

- Overstreet DH** (1993). The Flinders sensitive line rats: a genetic animal model of depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 17(1):51-68.
- Overstreet DH, Knapp DJ, Moy SS, Breese GR** (2003). A 5-HT_{1A} agonist and a 5-HT_{2c} antagonist reduce social interaction deficit induced by multiple ethanol withdrawals in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 167(4):344-52.
- Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB** (2000). Paroxetine binding to the rat norepinephrine transporter in vivo. *Biol Psychiatry*. 47(9):842-5.
- Owens MJ, Knight DL, Nemeroff CB** (2001). Second-generation SSRIs: human monoamine transporter binding profile of escitalopram and R-fluoxetine. *Biol Psychiatry*. 50(5):345-50.
- Owens MJ, Krulewicz S, Simon JS, Sheehan DV, Thase ME, et al.** (2008). Estimates of serotonin and norepinephrine transporter inhibition in depressed patients treated with paroxetine or venlafaxine. *Neuropsychopharmacology*. 33(13):3201-12.
- Pacher P, Kecskemeti V** (2004) Trends in the development of new antidepressants. Is there a light at the end of the tunnel? *Curr Med Chem*. 11(7):925-43.
- Papelbaum M, Lemos HM, Duchesne M, Kupfer R, Moreira RO, et al.** (2010). The association between quality of life, depressive symptoms and glycemic control in a group of type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract*. 89(3):227-30.
- Papp M, Moryl E, Willner P** (1996). Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. *Eur J Pharmacol*. 296(2):129-36
- Parks CL, Robinson PS, Sibille E, Shenk T, et al.** (1998). Increased anxiety of mice lacking the serotonin_{1A} receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18): 10734-10739.
- Parsey RV, Olvet DM, Oquendo MA, Huang YY, Ogden RT, et al.** (2006). Higher 5-HT_{1A} receptor binding potential during a major depressive episode predicts poor treatment response: preliminary data from a naturalistic study. *Neuropsychopharmacology*. 31(8):1745-9.
- Parsey RV, Oquendo MA, Ogden RT, Olvet DM, Simpson N, et al.** (2006). Altered serotonin 1A binding in major depression: a [carbonyl-C-11]WAY100635 positron emission tomography study. *Biol Psychiatry*. 59(2):106-13.
- Parsons LH, Kerr TM, Tecott LH** (2001). 5-HT_{1A} receptor mutant mice exhibit enhanced tonic, stress-induced and fluoxetine-induced serotonergic neurotransmission. *J Neurochem*. 77(2):607-17.
- Patel JG, Bartoszyk GD, Edwards E, Ashby CR Jr** (2004). The highly selective 5-hydroxytryptamine (5-HT)_{2A} receptor antagonist, EMD 281014, significantly increases swimming and decreases immobility in male congenital learned helpless rats in the forced swim test. *Synapse*. 52(1):73-5.
- Pazos A, Cortés R, Palacios JM** (1985). Quantitative autoradiographic mapping of serotonin receptors in the rat brain. II. Serotonin-2 receptors. *Brain Res*. 346(2):231-49.
- Pérez V, Gilaberte I, Faries D, Alvarez E, Artigas F** (1997). Randomised, double-blind, placebo-controlled trial of pindolol in combination with fluoxetine antidepressant treatment. *Lancet*. 349(9065):1594-7.

- Perona MT, Waters S, Hall FS, Sora I, Lesch KP, et al.** (2008). Animal models of depression in dopamine, serotonin, and norepinephrine transporter knockout mice: prominent effects of dopamine transporter deletions. *Behav Pharmacol.* 19(5-6):566-74.
- Peroutka SJ, Snyder SH** (1980). Regulation of serotonin₂ (5-HT₂) receptors labeled with [3H]spiroperidol by chronic treatment with the antidepressant amitriptyline. *J Pharmacol Exp Ther.* 215(3):582-7.
- Perry EB, Berman RM, Sanacora G, Anand A, Lynch-Colonese K, et al.** (2004). Pindolol augmentation in depressed patients resistant to selective serotonin reuptake inhibitors: a double-blind, randomized, controlled trial. *J Clin Psychiatry.* 65(2):238-43.
- Pierucci M, Di Matteo V, Esposito E** (2004). Stimulation of serotonin_{2C} receptors blocks the hyperactivation of midbrain dopamine neurons induced by nicotine administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 309(1):109-18.
- Piñeyro G, Castanon N, Hen R, Blier P** (1995a). Regulation of [3H]5-HT release in raphe, frontal cortex and hippocampus of 5-HT_{1B} knock-out mice. *Neuroreport.* 7(1):353-9.
- Piñeyro G, de Montigny C, Blier P** (1995b). 5-HT_{1D} receptors regulate 5-HT release in the rat raphe nuclei. In vivo voltammetry and in vitro superfusion studies. *Neuropsychopharmacology.* 13(3):249-60.
- Pirker W, Asenbaum S, Kasper S, Walter H, Angelberger P, et al.** (1995). beta-CIT SPECT demonstrates blockade of 5HT-uptake sites by citalopram in the human brain in vivo. *J Neural Transm Gen Sect.* 100(3):247-56.
- Pittenger C, Duman RS** (2008). Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology.* 33(1):88-109.
- Plenge P, Møllerup ET** (2003). Pindolol and the acceleration of the antidepressant response. *J Affect Disord.* 75(3):285-9.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G** (1992). Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. *J Neurosci.* 12(2): 440-453.
- Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G** (1994). Distribution of the serotonin 5-HT₂ receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* 23(1-2):163-78.
- Popa D, Cerdan J, Repérant C, Guiard BP, Guilloux JP, et al.** (2010). A longitudinal study of 5-HT outflow during chronic fluoxetine treatment using a new technique of chronic microdialysis in a highly emotional mouse strain. *Eur J Pharmacol.* 628(1-3):83-90.
- Porcelli S, Drago A, Fabbri C, Serretti A** (2011). Mechanisms of antidepressant action: an integrated dopaminergic perspective. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 35(7):1532-43.
- Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M** (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266(5604): 730-732.

- Portella MJ, de Diego-Adeliño J, Ballesteros J, Puigdemont D, Oller S, et al.** (2011). Can we really accelerate and enhance the selective serotonin reuptake inhibitor antidepressant effect? A randomized clinical trial and a meta-analysis of pindolol in nonresistant depression. *J Clin Psychiatry*. 72(7):962-9.
- Prins J, Olivier B, Korte SM** (2011). Triple reuptake inhibitors for treating subtypes of major depressive disorder: the monoamine hypothesis revisited. *Expert Opin Investig Drugs*. 20(8):1107-30.
- Qian Y, Melikian HE, Rye DB, Levey AI, Blakely RD** (1995). Identification and characterization of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins using site-specific antibodies. *J Neurosci*. 15(2):1261-74.
- Quérée P, Peters S, Sharp T** (2009). Further pharmacological characterization of 5-HT_{2C} receptor agonist-induced inhibition of 5-HT neuronal activity in the dorsal raphe nucleus in vivo. *Br J Pharmacol*. 158(6):1477-85.
- Quasted DJ, Sargent PA, Cowen PJ** (1997). SSRI treatment decreases prolactin and hyperthermic responses to mCPP. *Psychopharmacology (Berl)*. 133(3):305-8.
- Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF** (1994). Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology*. 60(4):436-44.
- Rainbow TC, Parsons B, Wolfe BB** (1984). Quantitative autoradiography of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(5):1585-9.
- Rainer Q, Xia L, Guilloux JP, Gabriel C, Mocaër E, et al.** (2010). Beneficial behavioural and neurogenic effects of agomelatine in a model of depression/anxiety. *Int J Neuropsychopharmacol*. [Epub ahead of print]
- Rajkowska G, Miguel-Hidalgo JJ, Wei J, Dilley G, Pittman SD, et al.** (1999). Morphometric evidence for neuronal and glial prefrontal cell pathology in major depression. *Biol Psychiatry*. 45(9):1085-98.
- Ramboz S, Oosting R, Amara DA, Kung HF, et al.** (1998). Serotonin receptor 1A knockout: an animal model of anxiety-related disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24): 14476-14481.
- Raote I, Bhattacharya A, Panicker MM** (2007). *Serotonin 2A (5-HT_{2A}) Receptor Function: Ligand-Dependent Mechanisms and Pathways*. Serotonin Receptors in Neurobiology. Boca Raton (FL): CRC Press; Chapter 6.
- Rapaport MH, Gharabawi GM, Canuso CM, Mahmoud RA, Keller MB, et al.** (2006). Effects of risperidone augmentation in patients with treatment-resistant depression: Results of open-label treatment followed by double-blind continuation. *Neuropsychopharmacology*. 31(11):2514.
- Rasmussen K, McCreary AC, Shanks EA** (2004). Attenuation of the effects of fluoxetine on serotonergic neuronal activity by pindolol in rats. *Neurosci Lett*. 355(1-2):1-4.

- Raurich A, Mengod G, Artigas F, Cortés R** (1999). Displacement of the binding of 5-HT(1A) receptor ligands to pre- and postsynaptic receptors by (-)pindolol. A comparative study in rodent, primate and human brain. *Synapse*. 34(1):68-76.
- Ray WA, Chung CP, Murray KT, Hall K, Stein CM** (2009). Atypical antipsychotic drugs and the risk of sudden cardiac death. *N Engl J Med*. 360(3):225-35.
- Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, et al.** (2001). Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther*, 92(2-3): 179-212.
- Raymond JR, Olsen CL, Gettys TW** (1993). Cell-specific physical and functional coupling of human 5-HT1A receptors to inhibitory G protein alpha-subunits and lack of coupling to Gs alpha. *Biochemistry*, 32(41): 11064-11073.
- Reader TA, Brière R, Grondin L, Ferron A** (1986). Effects of p-chlorophenylalanine on cortical monoamines and on the activity of noradrenergic neurons. *Neurochem Res*. 11(7):1025-35.
- Redrobe JP, MacSweeney CP, Bourin M** (1996). The role of 5-HT1A and 5-HT1B receptors in antidepressant drug actions in the mouse forced swimming test. *Eur J Pharmacol*. 318(2-3):213-20.
- Reed AL, Happe HK, Petty F, Bylund DB** (2008). Juvenile rats in the forced-swim test model the human response to antidepressant treatment for pediatric depression. *Psychopharmacology (Berl)*. 197(3):433-41.
- Richardson-Jones JW, Craige CP, Guiard BP, Stephen A, Metzger KL, et al.** (2010). 5-HT1A autoreceptor levels determine vulnerability to stress and response to antidepressants. *Neuron*. 65(1):40-52.
- Richelson E, Pfenning M** (1984). Blockade by antidepressants and related compounds of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes: most antidepressants selectively block norepinephrine uptake. *Eur J Pharmacol*. 104(3-4):277-86.
- Richer M, Hen R, Blier P** (2002). Modification of serotonin neuron properties in mice lacking 5-HT1A receptors. *Eur J Pharmacol*. 435(2-3):195-203.
- Rodríguez JJ, Doherty MD, Pickel VM** (2000). N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the ventral tegmental area: subcellular distribution and colocalization with 5-hydroxytryptamine(2A) receptors. *J Neurosci Res*. 60(2):202-11.
- Rogóż Z** (2010). Effects of co-treatment with mirtazapine and low doses of risperidone on immobility time in the forced swimming test in mice. *Pharmacol Rep*. 62(6):1191-6.
- Romero L, Bel N, Artigas F, de Montigny C, Blier P** (1996). Effect of pindolol on the function of pre- and postsynaptic 5-HT1A receptors: in vivo microdialysis and electrophysiological studies in the rat brain. *Neuropsychopharmacology*. 15(4):349-60.
- Rosenzweig-Lipson S, Sabb A, Stack G, Mitchell P, Lucki I, et al.** (2007). Antidepressant-like effects of the novel, selective, 5-HT2C receptor agonist WAY-163909 in rodents. *Psychopharmacology (Berl)*. 192(2):159-70.

- Rossi DV, Burke TF, McCasland M, Hensler JG** (2008). Serotonin-1A receptor function in the dorsal raphe nucleus following chronic administration of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline. *J Neurochem.* 105(4):1091-9.
- Roth BL, Berry SA, Kroeze WK, Willins DL, Kristiansen K** (1998). Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. *Crit Rev Neurobiol.* 12(4):319-38.
- Rubin RT, Poland RE, Lesser IM, Martin DJ, Blodgett AL, et al.** (1987). Neuroendocrine aspects of primary endogenous depression. III. Cortisol secretion in relation to diagnosis and symptom patterns. *Psychol Med.* 17(3):609-19.
- Rudnick G, Wall SC** (1992a). The molecular mechanism of "ecstasy" [3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA)]: serotonin transporters are targets for MDMA-induced serotonin release. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(5):1817-21.
- Rudnick G, Wall SC** (1992b). p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters. *Biochemistry.* 31(29):6710-8.
- Ruhé HG, Ooteman W, Booij J, Michel MC, Moeton M, et al.** (2009). Serotonin transporter gene promoter polymorphisms modify the association between paroxetine serotonin transporter occupancy and clinical response in major depressive disorder. *Pharmacogenet Genomics.* 19(1):67-76.
- Saavedra JM, Grobecker H, Zivin J** (1976). Catecholamines in the raphe nuclei of the rat. *Brain Res.* 114(2):337-45.
- Samuels BA, Hen R** (2011). Neurogenesis and affective disorders. *Eur J Neurosci.* 33(6):1152-9.
- Sánchez C, Bergqvist PB, Brennum LT, Gupta S, Hogg S, et al.** (2003). Escitalopram, the S-(+)-enantiomer of citalopram, is a selective serotonin reuptake inhibitor with potent effects in animal models predictive of antidepressant and anxiolytic activities. *Psychopharmacology (Berl).* 167(4):353-62.
- Sánchez C, Bøgesø KP, Ebert B, Reines EH, Braestrup C** (2004). Escitalopram versus citalopram: the surprising role of the R-enantiomer. *Psychopharmacology (Berl).* 174(2):163-76.
- Sánchez C, Larsen C, Gupta S** (2002). Escitalopram, the most selective serotonin reuptake inhibitor - in vitro data. Poster presented at the 42nd Annual Meeting of the Scandinavian College of Neuropsychopharmacology (SCNP), Juan Les Pins, France, April 18–21.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, et al.** (2003). Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science.* 301(5634):805-9.
- Sapolsky RM** (2000a). Glucocorticoids and hippocampal atrophy in neuropsychiatric disorders. *Arch Gen Psychiatry.* 57(10):925-35.
- Sapolsky RM** (2000b). The possibility of neurotoxicity in the hippocampus in major depression: a primer on neuron death. *Biol Psychiatry.* 48(8):755-65.

- Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, et al.** (2000). Brain serotonin_{1A} receptor binding measured by positron emission tomography with [11C]WAY-100635: effects of depression and antidepressant treatment. *Arch Gen Psychiatry*. 57(2):174-80.
- Sargent PA, Rabiner EA, Bhagwagar Z, Clark L, Cowen P, et al.** (2010). 5-HT_{1A} receptor binding in euthymic bipolar patients using positron emission tomography with [carbonyl-(11C)]WAY-100635. *J Affect Disord*. 123(1-3):77-80.
- Sato K, Yoshida K, Takahashi H, Ito K, Kamata M, et al.** (2002). Association between -1438G/A promoter polymorphism in the 5-HT_{2A} receptor gene and fluvoxamine response in Japanese patients with major depressive disorder. *Neuropsychobiology*. 46(3):136-40.
- Savitz J, Lucki I, Drevets WC** (2009). 5-HT_{1A} receptor function in major depressive disorder. *Prog Neurobiol*. 88(1):17-31.
- Savitz JB, Drevets WC** (2009). Imaging phenotypes of major depressive disorder: genetic correlates. *Neuroscience*. 164(1):300-30.
- Sayer TJ, Hannon SD, Redfern PH, Martin KF** (1999). Diurnal variation in 5-HT_{1B} autoreceptor function in the anterior hypothalamus in vivo: effect of chronic antidepressant drug treatment. *Br J Pharmacol*. 126(8):1777-84.
- Schechter LE, Bolanos FJ, Gozlan H, Lanfumey L, et al.** (1990). Alterations of central serotonergic and dopaminergic neurotransmission in rats chronically treated with ipsapirone: biochemical and electrophysiological studies. *J Pharmacol Exp Ther*, 255(3): 1335-1347.
- Schildkraut JJ** (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 122(5):509-22.
- Schoeffter P, Hoyer D** (1989). 5-Hydroxytryptamine 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors mediating inhibition of adenylate cyclase activity. Pharmacological comparison with special reference to the effects of yohimbine, rauwolscine and some beta-adrenoceptor antagonists. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 340(3): 285-292.
- Schroeter S, Apparsundaram S, Wiley RG, Miner LH, Sesack SR, et al.** (2000). Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive l-norepinephrine transporter. *J Comp Neurol*. 420(2):211-32.
- Seager MA, Barth VN, Phebus LA, Rasmussen K** (2005). Chronic coadministration of olanzapine and fluoxetine activates locus coeruleus neurons in rats: implications for bipolar disorder. *Psychopharmacology (Berl)*. 181(1):126-33.
- Seeman P, Tallerico T, Ko F, Tenn C, Kapur S** (2002). Amphetamine-sensitized animals show a marked increase in dopamine D₂ high receptors occupied by endogenous dopamine, even in the absence of acute challenges. *Synapse*. 46(4):235-9.
- Serrats J, Mengod G, Cortés R** (2005). Expression of serotonin 5-HT_{2C} receptors in GABAergic cells of the anterior raphe nuclei. *J Chem Neuroanat*. 29(2):83-91.

- Serretti A, Benedetti F, Zanardi R, Smeraldi E** (2005). The influence of Serotonin Transporter Promoter Polymorphism (SERTPR) and other polymorphisms of the serotonin pathway on the efficacy of antidepressant treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29(6):1074-84.
- Serretti A, Cusin C, Rossini D, Artioli P, Dotoli D, et al.** (2004). Further evidence of a combined effect of SERTPR and TPH on SSRIs response in mood disorders. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 129B(1):36-40.
- Sevy S, Papadimitriou GN, Surmont DW, Goldman S, Mendlewicz J** (1989). Noradrenergic function in generalized anxiety disorder, major depressive disorder, and healthy subjects. *Biol Psychiatry*. 25(2):141-52.
- Shachar D, Klein E, Tabak A, Finberg JP** (1997). Effect of single and repeated administration of fluvoxamine on noradrenaline release in rat brain. *Eur J Pharmacol* 332(3): 237-243.
- Shah PJ, Ebmeier KP, Glabus MF, Goodwin GM** (1998). Cortical grey matter reductions associated with treatment-resistant chronic unipolar depression. Controlled magnetic resonance imaging study. *Br J Psychiatry*. 172:527-32.
- Sharp T, Boothman L, Raley J, Qu     P** (2007). Important messages in the 'post': recent discoveries in 5-HT neurone feedback control. *Trends Pharmacol Sci*. 28(12):629-36.
- Sharp T, Bramwell SR, Grahame-Smith DG** (1990). Release of endogenous 5-hydroxytryptamine in rat ventral hippocampus evoked by electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus as detected by microdialysis: sensitivity to tetrodotoxin, calcium and calcium antagonists. *Neuroscience*, 39(3): 629-637.
- Sheline YI, Gado MH, Kraemer HC** (2003). Untreated depression and hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*. 160(8):1516-8.
- Sheline YI, Sanghavi M, Mintun MA, Gado MH** (1999). Depression duration but not age predicts hippocampal volume loss in medically healthy women with recurrent major depression. *J Neurosci*. 19(12):5034-43.
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW** (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(9):3908-13.
- Shelton RC, Stahl SM** (2004). Risperidone and paroxetine given singly and in combination for bipolar depression. *J Clin Psychiatry*. 65(12):1715-9.
- Shelton RC, Tollefson GD, Tohen M, Stahl S, Gannon KS, et al.** (2001). A novel augmentation strategy for treating resistant major depression. *Am J Psychiatry*. 158(1):131-4.
- Shen C, Li H, Meller E** (2002). Repeated treatment with antidepressants differentially alters 5-HT_{1A} agonist-stimulated [35S]GTP gamma S binding in rat brain regions. *Neuropharmacology*. 42(8):1031-8.
- Shih JC** (2004). Cloning, after cloning, knock-out mice, and physiological functions of MAO A and B. *Neurotoxicology*, 25(1-2): 21-30.

- Sibille E, Sarnyai Z, Benjamin D, Gal J, Baker H, et al.** (1997). Antisense inhibition of 5-hydroxytryptamine_{2A} receptor induces an antidepressant-like effect in mice. *Mol Pharmacol.* 52(6):1056-63.
- Sibon I, Benkelfat C, Gravel P, Aznavour N, Costes N, et al.** (2008). Decreased [¹⁸F]MPPF binding potential in the dorsal raphe nucleus after a single oral dose of fluoxetine: a positron-emission tomography study in healthy volunteers. *Biol Psychiatry.* 63(12):1135-40.
- Silver H, Susser E, Danovich L, Bilker W, Youdim M, et al.** (2011). SSRI augmentation of antipsychotic alters expression of GABA(A) receptor and related genes in PMC of schizophrenia patients. *Int J Neuropsychopharmacol.* 14(5):573-84.
- Skolnick P, Krieter P, Tizzano J, Basile A, Popik P, et al.** (2006). Preclinical and clinical pharmacology of DOV 216,303, a "triple" reuptake inhibitor. *CNS Drug Rev.* 12(2):123-34.
- Smeraldi E, Serretti A, Artioli P, Lorenzi C, Catalano M** (2006). Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: possible pharmacogenetic implications of rare variants. *Psychiatr Genet.* 16(4):153-8.
- Söderpalm B, Engel JA** (1990). Serotonergic involvement in conflict behaviour. *Eur Neuropsychopharmacol.* 1(1):7-13.
- Sokolski KN, Conney JC, Brown BJ, DeMet EM** (2004). Once-daily high-dose pindolol for SSRI-refractory depression. *Psychiatry Res.* 125(2):81-6.
- Sotty F, Folgering JH, Brennum LT, Hogg S, Mørk A, et al.** (2009). Relevance of dorsal raphe nucleus firing in serotonin 5-HT_{2C} receptor blockade-induced augmentation of SSRIs effects. *Neuropharmacology.* 57(1):18-24.
- Spindelegger C, Lanzenberger R, Wadsak W, Mien LK, Stein P, et al.** (2009). Influence of escitalopram treatment on 5-HT_{1A} receptor binding in limbic regions in patients with anxiety disorders. *Mol Psychiatry.* 14(11):1040-50.
- Sprouse J, Braselton J, Reynolds L** (2000). 5-HT_{1A} agonist potential of pindolol: electrophysiologic studies in the dorsal raphe nucleus and hippocampus. *Biol Psychiatry.* 47(12):1050-5.
- Steffens DC, Byrum CE, McQuoid DR, Greenberg DL, Payne ME, et al.** (2000). Hippocampal volume in geriatric depression. *Biol Psychiatry.* 48(4):301-9.
- Stockmeier CA, Dilley GE, Shapiro LA, Overholser JC, Thompson PA, et al.** (1997). Serotonin receptors in suicide victims with major depression. *Neuropsychopharmacology.* 16(2):162-73.
- Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, et al.** (1998). Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression-postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci.* 18(18):7394-401.
- Stutzmann JM, Eon B, Darche F, Lucas M, Rataud J, et al.** (1991). Are 5-HT₂ antagonists endowed with anxiolytic properties in rodents? *Neurosci Lett.* 128(1):4-8.

- Suwabe A, Kubota M, Niwa M, Kobayashi K, Kanba S** (2000). Effect of a 5-HT(1A) receptor agonist, flesinoxan, on the extracellular noradrenaline level in the hippocampus and on the locomotor activity of rats. *Brain Res.* 858(2):393-401.
- Suzuki M, Matsuda T, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, et al.** (1995). Increase of noradrenaline release in the hypothalamus of freely moving rat by postsynaptic 5-hydroxytryptamine1A receptor activation. *Br J Pharmacol.* 115(4):703-11.
- Suzuki Y, Sawamura K, Someya T** (2006). Polymorphisms in the 5-hydroxytryptamine 2A receptor and CytochromeP4502D6 genes synergistically predict fluvoxamine-induced side effects in japanese depressed patients. *Neuropsychopharmacology.* 31(4):825-31.
- Szabo ST, Blier P** (2001). Functional and pharmacological characterization of the modulatory role of serotonin on the firing activity of locus coeruleus norepinephrine neurons. *Brain Res.* 922(1):9-20.
- Szabo ST, Blier P** (2002). Effects of serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) reuptake inhibition plus 5-HT(2A) receptor antagonism on the firing activity of norepinephrine neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 302(3):983-91.
- Takano H, Ito H, Takahashi H, Arakawa R, Okumura M, et al.** (2011). Serotonergic neurotransmission in the living human brain: a positron emission tomography study using [¹¹C]dasb and [¹¹C]WAY100635 in young healthy men. *Synapse.* 65(7):624-33.
- Tanaka N, Nakamura E, Ohkura M, Kuwabara M, Yamashita A, et al.** (2008). Both 5-hydroxytryptamine 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B} receptors are involved in the vasoconstrictor response to 5-HT in the human isolated internal thoracic artery. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 35(7):836-40.
- Tatarczyńska E, Kłodzińska A, Chojnacka-Wójcik E** (2002). Effects of combined administration of 5-HT_{1A} and/or 5-HT_{1B} receptor antagonists and paroxetine or fluoxetine in the forced swimming test in rats. *Pol J Pharmacol.* 54(6):615-23.
- Tecott LH, Sun LM, Akana SF, Strack AM, Lowenstein DH, et al.** (1995). Eating disorder and epilepsy in mice lacking 5-HT_{2c} serotonin receptors. *Nature.* 374(6522):542-6.
- Thase ME, Corya SA, Osuntokun O, Case M, Henley DB, et al.** (2007). A randomized, double-blind comparison of olanzapine/fluoxetine combination, olanzapine, and fluoxetine in treatment-resistant major depressive disorder. *J Clin Psychiatry.* 68(2):224-36.
- Thiébot MH, Martin P, Puech AJ** (1992). Animal behavioural studies in the evaluation of antidepressant drugs. *Br J Psychiatry Suppl.* 15:44-50.
- Tohen M, Case M, Trivedi MH, Thase ME, Burke SJ, et al.** (2010). Olanzapine/fluoxetine combination in patients with treatment-resistant depression: rapid onset of therapeutic response and its predictive value for subsequent overall response in a pooled analysis of 5 studies. *J Clin Psychiatry.* 71(4):451-62.
- Tome MB, Isaac MT, Harte R, Holland C** (1997). Paroxetine and pindolol: a randomized trial of serotonergic autoreceptor blockade in the reduction of antidepressant latency. *Int Clin Psychopharmacol.* 12(2):81-9.

- Torres GE, Caron MG** (2003). Center stage for the serotonin transporter: a gain-of-function polymorphism in persons with obsessive-compulsive disorder. *Mol Pharmacol*. 64(2):196-8.
- Trajkovska V, Kirkegaard L, Krey G, Marcussen AB, Thomsen MS, et al.** (2009). Activation of glucocorticoid receptors increases 5-HT_{2A} receptor levels. *Exp Neurol*. 218(1):83-91.
- Tremblay P, Blier P** (2006). Catecholaminergic strategies for the treatment of major depression. *Curr Drug Targets*. 7(2):149-58.
- Trillat AC, Malagié I, Searce K, Pons D, Anmella MC, et al.** (1997). Regulation of serotonin release in the frontal cortex and ventral hippocampus of homozygous mice lacking 5-HT_{1B} receptors: in vivo microdialysis studies. *J Neurochem*. 69(5):2019-25.
- Uher R, Dernovsek MZ, Mors O, Hauser J, Souery D, et al.** (2011). Melancholic, atypical and anxious depression subtypes and outcome of treatment with escitalopram and nortriptyline. *J Affect Disord*. 132(1-2):112-20.
- Van Gorp F, Duffull S, Hackett LP, Isbister GK** (2011). Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of escitalopram in overdose and the effect of activated charcoal. *Br J Clin Pharmacol*. [Epub ahead of print]
- Van Oekelen D, Luyten WH, Leysen JE** (2003). 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. *Life Sci*. 72(22):2429-49.
- Vangveravong S, Zhang Z, Taylor M, Bearden M, Xu J, et al.** (2011). Synthesis and characterization of selective dopamine D₂ receptor ligands using aripiprazole as the lead compound. *Bioorg Med Chem*. 19(11):3502-11.
- Varrault A, Journot L, Audigier Y, Bockaert J** (1992). Transfection of human 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors in NIH-3T3 fibroblasts: effects of increasing receptor density on the coupling of 5-hydroxytryptamine_{1A} receptors to adenylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, 41(6): 999-1007.
- Vázquez-Borsetti P, Celada P, Cortés R, Artigas F** (2011). Simultaneous projections from prefrontal cortex to dopaminergic and serotonergic nuclei. *Int J Neuropsychopharmacol*. 14(3):289-302.
- Vázquez-Borsetti P, Cortés R, Artigas F** (2009). Pyramidal neurons in rat prefrontal cortex projecting to ventral tegmental area and dorsal raphe nucleus express 5-HT_{2A} receptors. *Cereb Cortex*. 19(7):1678-86.
- Vizi ES, Zsilla G, Caron MG, Kiss JP** (2004). Uptake and release of norepinephrine by serotonergic terminals in norepinephrine transporter knock-out mice: implications for the action of selective serotonin reuptake inhibitors. *J Neurosci* 24(36): 7888-7894.
- Von Moltke LL, Greenblatt DJ, Giancarlo GM, Granda BW, Harmatz JS, et al.** (2001). Escitalopram (S-citalopram) and its metabolites in vitro: cytochromes mediating biotransformation, inhibitory effects, and comparison to R-citalopram. *Drug Metab Dispos*. 29(8):1102-9.

- Walther DJ, Peter JU, Winter S, Hölting M, Paulmann N, et al.** (2003). Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. *Cell*. 115(7):851-62.
- Wang Q, O'Brien PJ, Chen CX, Cho DS, Murray JM, et al.** (2000). Altered G protein-coupling functions of RNA editing isoform and splicing variant serotonin_{2C} receptors. *J Neurochem*. 74(3):1290-300.
- Weikop P, Kehr J, Scheel-Krüger J** (2004). The role of alpha₁- and alpha₂-adrenoreceptors on venlafaxine-induced elevation of extracellular serotonin, noradrenaline and dopamine levels in the rat prefrontal cortex and hippocampus. *J Psychopharmacol*. 18(3):395-403.
- Weikop P, Yoshitake T, Kehr J** (2007). Differential effects of adjunctive methylphenidate and citalopram on extracellular levels of serotonin, noradrenaline and dopamine in the rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol*. 17(10):658-71.
- Weissbach H, Redfield BG** (1960). Factors affecting the uptake of 5-hydroxytryptamine by human platelets in an inorganic medium. *J Biol Chem*. 235:3287-91.
- Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, González-Maeso J, et al.** (2006). Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. *Science*. 313(5786):536-40.
- Wilkie MJ, Smith G, Day RK, Matthews K, Smith D, et al.** (2009). Polymorphisms in the SLC6A4 and HTR2A genes influence treatment outcome following antidepressant therapy. *Pharmacogenomics J*. 9(1):61-70.
- Willeit M, Praschak-Rieder N** (2010). Imaging the effects of genetic polymorphisms on radioligand binding in the living human brain: A review on genetic neuroreceptor imaging of monoaminergic systems in psychiatry. *Neuroimage*. 53(3):878-92.
- Winter JC, Eckler JR, Rice KC, Rabin RA** (2005). Serotonergic/glutamatergic interactions: potentiation of phencyclidine-induced stimulus control by citalopram. *Pharmacol Biochem Behav*. 81(3):694-700.
- Wong DT, Robertson DW, Bymaster FP, Krushinski JH, Reid LR** (1988). LY227942, an inhibitor of serotonin and norepinephrine uptake: biochemical pharmacology of a potential antidepressant drug. *Life Sci*. 43(24):2049-57.
- Wood MD, Reavill C, Trail B, Wilson A, Stean T, et al.** (2001). SB-243213; a selective 5-HT_{2C} receptor inverse agonist with improved anxiolytic profile: lack of tolerance and withdrawal anxiety. *Neuropharmacology*. 41(2):186-99.
- Yamauchi M, Miyara T, Matsushima T, Imanishi T** (2006). Desensitization of 5-HT_{2A} receptor function by chronic administration of selective serotonin reuptake inhibitors. *Brain Res*. 1067(1):164-9.
- Yang W, Wang Q, Kanis SJ, Murray JM, Nishikura K** (2004). Altered RNA editing of serotonin 5-HT_{2C} receptor induced by interferon: implications for depression associated with cytokine therapy. *Brain Res Mol Brain Res*. 124(1):70-8.

- Yevtushenko OO, Oros MM, Reynolds GP** (2010). Early response to selective serotonin reuptake inhibitors in panic disorder is associated with a functional 5-HT_{1A} receptor gene polymorphism. *J Affect Disord.* 123(1-3):308-11.
- Yu YW, Tsai SJ, Chen TJ, Lin CH, Hong CJ** (2002). Association study of the serotonin transporter promoter polymorphism and symptomatology and antidepressant response in major depressive disorders. *Mol Psychiatry.* 7(10):1115-9.
- Yu YW, Tsai SJ, Liou YJ, Hong CJ, Chen TJ** (2006). Association study of two serotonin 1A receptor gene polymorphisms and fluoxetine treatment response in Chinese major depressive disorders. *Eur Neuropsychopharmacol.* 16(7):498-503.
- Zanardi R, Artigas F, Franchini L, Sforzini L, Gasperini M, et al.** (1997). How long should pindolol be associated with paroxetine to improve the antidepressant response? *J Clin Psychopharmacol.* 17(6):446-50.
- Zanardi R, Artigas F, Moresco R, Colombo C, Messa C, et al.** (2001a). Increased 5-hydroxytryptamine-2 receptor binding in the frontal cortex of depressed patients responding to paroxetine treatment: a positron emission tomography scan study. *J Clin Psychopharmacol.* 21(1):53-8.
- Zanardi R, Serretti A, Rossini D, Franchini L, Cusin C, et al.** (2001b). Factors affecting fluvoxamine antidepressant activity: influence of pindolol and 5-HTTLPR in delusional and nondelusional depression. *Biol Psychiatry.* 50(5):323-30.
- Zgombick JM, Borden LA, Cochran TL, Kucharewicz SA, et al.** (1993). Dual coupling of cloned human 5-hydroxytryptamine_{1D} alpha and 5-hydroxytryptamine_{1D} beta receptors stably expressed in murine fibroblasts: inhibition of adenylate cyclase and elevation of intracellular calcium concentrations via pertussis toxin-sensitive G protein(s). *Mol Pharmacol.* 44(3): 575-582.
- Zhang W, Perry KW, Wong DT, Potts BD, Bao J, et al.** (2000). Synergistic effects of olanzapine and other antipsychotic agents in combination with fluoxetine on norepinephrine and dopamine release in rat prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology.* 23(3):250-62.
- Zhong H, Haddjeri N, Sánchez C** (2011). Escitalopram, an antidepressant with an allosteric effect at the serotonin transporter-a review of current understanding of its mechanism of action. *Psychopharmacology (Berl)*. [Epub ahead of print]
- Zhou FC, Tao-Cheng JH, Segu L, Patel T, Wang Y** (1998). Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence. *Brain Res.* 805(1-2):241-54.
- Zuberi SI, Syed EU, Bhatti JA** (2011). Association of depression with treatment outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus: a cross-sectional study from Karachi, Pakistan. *BMC Psychiatry.* 11:27.

Cibles sérotoninergiques et non sérotoninergiques des ISRS: Approche Pharmacologique et Génétique *in vivo* chez la souris

Les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (5-HT) (ISRS) bloquent directement le transporteur de la 5-HT (SERT) et stimulent indirectement de multiples auto- et hétéro-récepteurs 5-HT par l'augmentation de la concentration extracellulaire de 5-HT dans la fente synaptique. Cependant, le rôle des différents récepteurs ainsi que leur interaction dans les effets thérapeutiques des ISRS restent mal connus. Nous avons tenté de les identifier à l'aide de tests neurochimiques (microdialyse intracérébrale *in vivo*) et électrophysiologiques en utilisant une approche pharmacologique (utilisation de escitalopram, de ligands des récepteurs 5-HT_{1A/2A}) et génétique (utilisation de souris knock-out [KO] SERT, 5-HT_{1A} ou 5-HT_{2A}). Les études neurochimiques et électrophysiologiques révèlent que les auto-(1A) et hétéro-(2A) récepteurs agissent de concert pour maintenir une influence inhibitrice sur le système sérotoninergique, en particulier, en réponse au escitalopram : l'absence d'un récepteur est compensée par une régulation de l'autre. Enfin, les souris KO SERT constituent un nouveau modèle pour tester le mécanisme du escitalopram dans l'augmentation des concentrations de noradrénaline (NA).

Mots Clés : Escitalopram, Autorécepteurs 5-HT_{1A}, Hétérorécepteur 5-HT_{2A}, Transporteur de la sérotonine, Cortex frontal, Microdialyse intracérébrale, Electrophysiologie, Dépression.

Serotonergic and non-serotonergic targets of SSRIs: *In vivo* Pharmacological and Genetic approaches in mice

Selective serotonin (5-HT) reuptake inhibitors (SSRIs) directly block the 5-HT transporter (SERT) and indirectly stimulate multiple 5-HT (auto- and hetero-) receptors by enhancing its extracellular levels in the synaptic cleft, although the role of particular receptors as well as interaction(s) among different receptors in the therapeutic effects of SSRIs is not fully understood. We tried to highlight it using neurochemical (*in vivo* intracerebral microdialysis) and electrophysiological tests with a pharmacological (using escitalopram, 5-HT_{1A/2A} receptors agonists and antagonists) and genetic (using SERT, 5-HT_{1A} ou 5-HT_{2A} receptor knock-out [KO] mice) approaches. Neurochemical and electrophysiological experiments indicated that 5-HT_{1A} auto- and 5-HT_{2A} hetero-receptors act in concert to maintain an inhibitory influence on the serotonergic system, particularly in response of escitalopram to increased levels of endogenous 5-HT: the absence of one receptor being compensated by an up-regulation of the other. Finally, SERT knockout mice might be a new model to test the mechanism of escitalopram for an increase of norephedrine (NE) level.