

Social and anxious-like behaviors alterations induced by clotiazepam injection.

E. Schott¹, M. Teixeira¹, J-L. Gillou²

Les troubles de l'agressivité et de l'anxiété ont souvent été traités séparément par l'utilisation d'antipsychotiques et d'anxiolytiques, respectivement. Néanmoins, l'anxiété est définie comme un état psychologique et neurologique propre à l'individu qui fait que le sujet traite les informations environnementales avec plus ou moins d'appréhension quand l'agressivité est une réaction agressive à la provocation avec perte de contrôle comportemental (Stanford et al., 2003). Nous pouvons donc affirmer que ces troubles du comportement découlent tous deux d'une perturbation du contrôle des émotions, permettant de contredire le concept d'indépendance de ces pathologies. En effet, dès 1960, (Ingram et Timbury, 1960) mettent en lumière l'augmentation des comportements agressifs chez des patients auxquels il avait été prescrit du Librium, un anxiolytique dont le principe actif est le chlordiazepoxide de la famille des benzodiazépines. Par la suite, de nombreuses études comportementales et pharmacologiques ont pu démontrer le lien entre ces deux troubles du comportement sans pour autant en déterminer la valence. En effet, certaines études affirment que les deux troubles sont corrélés négativement (Palanza et al., 1996) alors que d'autres prouvent l'existence d'une relation positive entre l'administration de chlordiazepoxide et l'augmentation du nombre de tentatives de morsure des furets sur une proie (Apfelbach, 1978). Toutefois, cette corrélation ne serait pas due à une augmentation du comportement de prédation mais à une levée d'inhibition importante induisant l'animal à développer principalement une stratégie d'attaque au détriment d'une stratégie de défense. Les réactions paradoxales d'agressivité sous chlordiazepoxide font donc l'objet d'un débat soutenu au sein de la communauté scientifique. Toutefois, d'autres molécules appartenant à la famille des benzodiazépines ont été découvert tel que le clotiazepam, principe actif du Veratran. Si les mécanismes de potentialisation de la fixation du GABA sur les récepteurs GABAergiques de type A induits par ces benzodiazépines sont largement présentés dans la littérature (John F. Tallman and Dorothy W Gallage, 1985), les conséquences de cette potentialisation sur les comportements agonistiques restent encore inconnues. L'objectif de cette étude est donc de déterminer si l'administration de clotiazepam (Veratran) induit une modification négative ou positive des comportements agonistiques chez la souris Cd1 en présence d'un congénère de souche C57BL6 dans le cadre des tests comportementaux Home Intruder et Neutral Cage.

MATERIEL & METHODES

Animaux & Groupes Expérimentaux

Les 32 animaux de cette étude étaient de souche Cd1 et de sexe masculin. Elles étaient logées dans des cages individuelles, avaient accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. Elles étaient maintenues dans une animalerie suivant un cycle jour/nuit de 12h/12h avec une période éclairée de 7h à 19h. Tous les comportements ont été étudiés durant la phase diurne. Le premier groupe était composé de 17 souris auxquelles nous avons administré du Veratran. Le deuxième groupe était composé de 15 souris auxquelles nous avons administré une solution saline.

Pharmacologie

Le Clotiazépam (Veratran) est une molécule appartenant à la famille des Benzodiazépines. Cette molécule a donc des effets myorelaxants et sédatifs qui pourraient induire une diminution de l'activité locomotrice de l'animal et donc une diminution des comportements exploratoires et agonistiques. Pour éviter ce biais, nous avons décidé d'administrer une faible dose de Clotiazépam (Veratran). L'effet anxiolytique, au contraire, induirait une augmentation des comportements d'exploration que nous voulons étudier. Les injections ont été réalisées 20 minutes avant chaque test comportemental.

Open field

Le test de l'Open field a été utilisé afin d'étudier l'effet anxiolytique du Veratran. Ce test comportemental comprend une arène carrée de fond blanc et parois jaunes ainsi qu'une caméra suspendue au-dessus du centre de l'arène permettant de retranscrire en temps réel les déplacements de l'animal sur un écran d'ordinateur quadrillé manuellement. Le dispositif est divisé en trois zones : les carrés accolés aux parois représentent la zone périphérique, les carrés du centre représentent la zone centrale et le carré central représente l'hypercentre (Fig. 1. A). L'effet anxiolytique du Veratran est mesuré par la saisie manuelle du nombre de carrés traversés ainsi que du temps passé (en seconde) dans chaque zone. Sachant que les souris choisissent préférentiellement de se déplacer le long des parois, nous considérons que la zone centrale et l'hypercentre sont des zones anxiogènes. L'anxiété de l'animal est également appréciée par observation des comportements stéréotypés tels que les toilettages ou les mictions et défécations. Le contrôle de l'activité locomotrice se fait par la mesure du nombre de carrés traversé par l'animal et des comportements stéréotypés comme le redressement avec appui sur la paroi. L'ensemble des expérimentateurs se trouvait dans une pièce séparée pour éviter toute influence sur le comportement exploratoire de l'animal.

¹ Master Neurosciences, Université de Bordeaux, Campus de Carreire Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5228

² Centre de Neurosciences Intégratives et Cognitives, Université de Bordeaux 1,

L'animal est placé dans le dispositif expérimental, la tête orientée vers un angle de l'arène. Le test dure 10 minutes et débute dès que l'animal se déplace en dehors de cet angle. Chaque paramètre est mesuré durant deux sessions de 5 minutes (Tableau 1).

Les test d'Agression : Home Intruder & Neutral Cage

Pour les tests Home Intruder et Neutral Cage, nous avons introduit une souris neutre n'ayant participé à aucun test comportemental, n'ayant subi aucune injection et étant considérée comme « étrangère ». La peur de l'ennemi pouvant inhiber l'expression des comportements agonistiques, nous avons choisi d'utiliser des souris neutres de souche C57BL/6 connues pour être plus petites que les souris de souche Cd1 et donc moins menaçantes.

Le test de Home Intruder est utilisé pour étudier les réactions de défense. Ce test s'effectue dans la cage d'élevage de la souris Cd1 considérée comme « familière » dans laquelle nous introduisons l'animal « étranger » (Fig. 1. B). La souris Cd1 est hébergée dans la cage d'élevage trois semaines avant de réaliser le test. En effet, d'après la courbe de développement des comportements de défense en fonction du temps passé en cage, l'animal familier exprime une agressivité moyenne après intrusion d'un animal étranger sur son territoire. Ainsi, la modification négative ou positive de ces comportements par le Veratran sera mieux observable et comparable à une souris contrôle (injection d'une solution saline) (Fig. 2). Le test dure 15 minutes et débute dès que la souris C57BL6 est introduite dans la cage.

Le test Neutral Cage est utilisé pour étudier les réactions offensives et s'effectue dans une cage neutre, inconnue des deux sujets. Le test dure 15 minutes et débute dès que les deux animaux sont tous deux introduits dans la cage neutre. Les deux souris doivent donc présenter des comportements agonistiques offensifs pour prendre possession du territoire.

Chaque test débute dès lors que les deux souris sont mises en contact. Les comportements des souris Cd1 sont mesurés durant une séance de 15 minutes pour chaque souris. Les mêmes paramètres sont étudiés au cours des deux tests (Tableau 2).

Test des barres fixes

Cette tâche permet de mesurer le tonus musculaire des animaux pour déterminer si l'injection de Veratran induit des effets

myorelaxants qui conduiraient à une diminution de l'activité exploratoire. Le dispositif se compose d'une barre en fer suspendue horizontalement à 30 cm de hauteur et délimitée à chaque extrémité par une plateforme circulaire. L'animal est déposé au milieu de la barre en fer et doit atteindre l'une des deux plateformes ou rester en équilibre durant 120 secondes pour considérer le test comme réussi (Fig. 1. D). Toute chute de l'animal est considérée comme un échec. Le test est arrêté si l'animal réalise 3 échecs et le temps de maintien le plus long est enregistré.

RESULTATS

Open field

Comme prédit, on constate que les animaux ayant été traité au Vératran – benzodiazépine aux propriétés anxiolytiques – sont plus à l'aise avec espaces ouverts. Le temps passés dans la zone centrale est significativement supérieur pour les souris traitées au Vératran ($F_{1,32} = 8,43$; $P = 0,0066$) ainsi que le nombre de passage dans cette zone ($F_{1,32} = 5,40$; $P = 0,0266$) et une latence entre le début du test et la première traversée plus faible ($F_{1,32} = 4,23$; $P = 0,0478$), illustrant un comportement moins anxieux.

Aucune différence dans le nombre de redressement de la souris n'a été observée. A contrario, on voit une diminution du nombre de toilettage ($F_{1,32} = 4,81$; $P = 0,0357$) chez les souris traitées. Ce comportement étant induit pas la peur, cela confirme une diminution de l'anxiété chez les souris traitées à la benzodiazépine. On constate une absence d'effets myorelaxants – sur la barre de traction – pouvant être induit par cette classes de molécules et une augmentation de l'activité locomotrice chez ces rats ($F_{1,32} = 4,85$; $P = 0,0349$).

Enfin, on voit que le traitement induit une réduction très significative de la miction ($F_{1,32} = 10,20$; $P = 0,0031$), sans effet sur la défécation, illustrant une réduction de la peur chez ces rats.

Home intruder vs Neutral Cage

Une modification du comportement social des souris est observée entre les différents tests mais aucun effet du Vératran sur ces interactions n'a été constaté. En effet, les comportements sociaux sont moins présents en nombre ($F_{1,32} = 15,074$; $P = 0,0005$) et en temps ($F_{1,32} = 33,100$; $P < 0,0001$) dans le test de Neutral cage. A l'inverse, le nombre de redressement est diminué. Le nombre de tentative de monte est augmenté dans le test de Neutral cage, sans pour autant avoir d'effet du traitement.

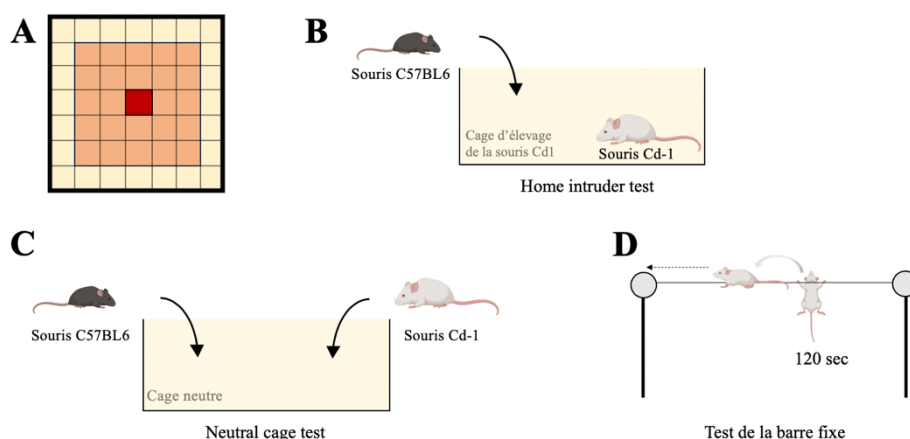


Fig. 1. Schématisation des dispositifs expérimentaux utilisés au cours de cette étude. (A) Dispositif du test comportemental « Open-Field » : la zone périphérique en jaune ; la zone centrale en orange et l'hypercentre en rouge. (B) Dispositif du test comportemental « Home Intruder ». Les animaux sont disposés dans la cage d'élevage de la souris Cd1 (en jaune). (C) Dispositif du test comportemental « Competition ». Les animaux sont disposés dans une nouvelle cage inconnue pour les deux sujets (en orange). (D) Dispositif du test moteur des barres fixes.

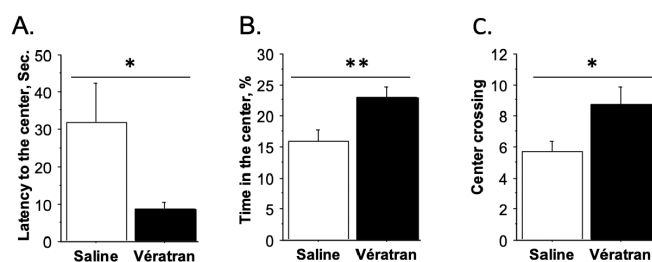


Fig 1. Interaction des souris saline (n = 18) et Vétratran (n = 16) avec le centre de l'Open-field. (A) Latence entre le début du test et la première traversée du centre de l'Open Field. (B) Temps passé au centre de la pièce, en secondes. (C) Nombre de passage au centre de la pièce. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

*P < 0.05, **P < 0.01 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

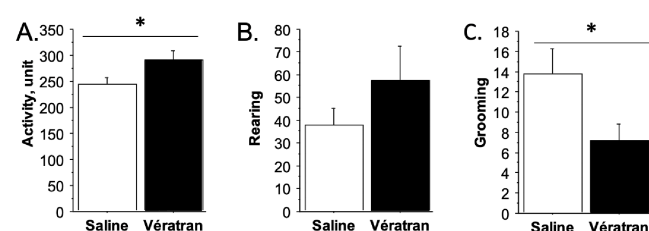


Fig 2. Réactions comportementales des souris contrôles (n = 18) et injectées au Vétratran (n = 16) durant le test d'Open-field. (A) Activité locomotrice, en nombre de carrés traversés. (B) Nombre de redressement. (C) Nombre de toilettage. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

*P < 0.05 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

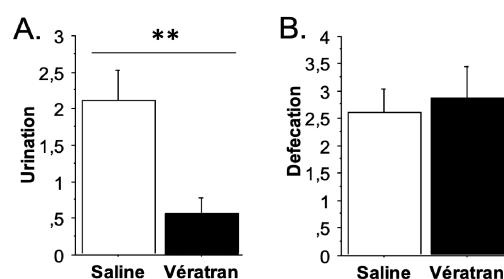


Fig 3. Réactions physiologiques des souris contrôles (n = 18) et injectées au Vétratran (n = 16) durant le test d'Open-field. (A) Nombre de mictions. (B) Nombre de défécations. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

**P < 0.01 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

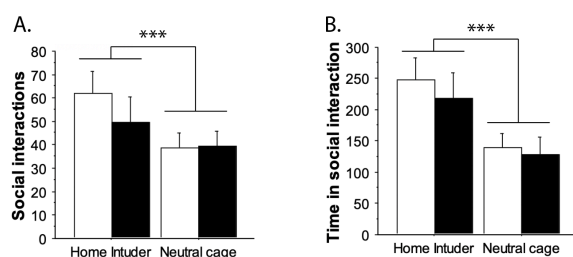


Fig 4. Interactions sociales des souris salines (n = 15) et Vétratran (n = 17) durant les tests de Home Intruder et Neutral Cage. (A) Nombre d'interactions sociales. (B) Temps d'interaction sociale, en secondes. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

**P < 0.01 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

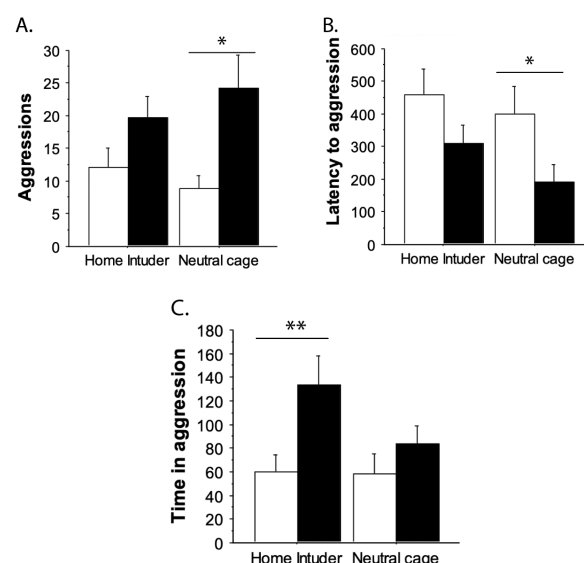


Fig. 5 Comportements d'agression des souris salines (n = 15) et Vétratran (n = 17) durant les tests de Home Intruder et Neutral Cage. (A) Nombre d'agressions. (B) Latence entre le début du test et la première agression. (C) Temps d'agression, en secondes. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

*P < 0.05 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

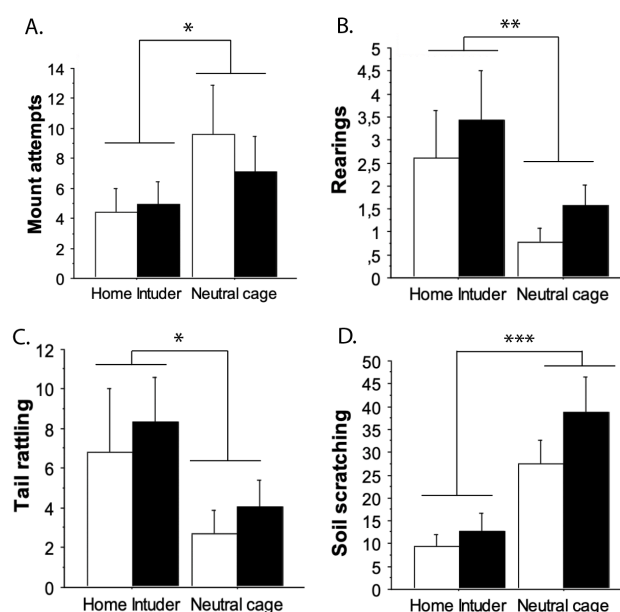


Fig. 6 Comportements non-agressifs des souris salines (n = 15) et Vétratran (n = 17) durant les tests de Home Intruder et Neutral Cage. (A) Nombre de tentatives de montes. (B) Nombre de redressements. (C) Nombre de tail rattling. (D) Nombre de grattage du sol. Les résultats sont exprimés en moyenne + SEM.

**P < 0.01 (Effet groupe, ANOVA à deux facteurs suivie d'un test post hoc de Scheffe).

Des différences dans les comportements agressifs ont également été notés dans l'un ou l'autre des tests. Une augmentation du nombre d'agressions ($F_{1,32} = 7,59$; $P = 0,0096$) et une réduction de la latence de la première agression induit par le Vératran ($F_{1,32} = 4,54$; $P = 0,0410$) dans le test de Neutral cage a été observé. Cependant, aucun effet significatif du facteur test n'est relevé. De plus, une augmentation du temps d'agression induit par le Vératran ($F_{1,32} = 6,27$; $P = 0,0176$) pour le test de Home intruder a été constaté sans effet du facteur test. Enfin, une augmentation du tail rattling ($F_{1,32} = 6,51$; $P = 0,157$) durant le test du Home intruder, sans effet du traitement.

DISCUSSION

Les résultats obtenus ci-dessus nous montre bien un effet anxiolytique du Vératran via une augmentation de l'interaction de l'animal avec le centre de la pièce et une diminution du nombre de toilettages et de mictions, concordant avec les résultats attendus au vu des propriétés des benzodiazépines.

L'augmentation de l'activité locomotrice en l'absence d'effet myorelaxant – pouvant être induit par cette classe de médicament – pourrait être expliqué par une diminution de l'anxiété et donc une augmentation du comportement exploratoire de l'animal.

Une augmentation des comportements exploratoires dans une cage inconnue par les deux souris pourrait expliquer la diminution des interactions sociales retrouvé dans le Neutral cage test, indépendamment des effets du traitement.

L'interprétation des résultats retrouvés pour les comportements agressifs sont plus compliqué à interpréter au vu des résultats contradictoires entre le temps d'agression et le nombre/latence de la première agression. Une explication pourrait être expliqué par une augmentation de l'activité locomotrice induit par le Vératran, induisant une augmentation du nombre d'agressions de courte durée dans le test de Neutral Cage. Ainsi, la souris dominante – familière avec la cage – s'attaque à la souris dominée durant des périodes prolongées pour défendre son territoire dans le Home intruder test alors qu'elle alternera exploration et les agressions de courte durée dans la cage neutre. Afin de comprendre les mécanismes sous-jacent cette agressivité, il serait intéressant d'étudier les taux de stéroïdes présents chez les animaux durant ces tests, ainsi que celui de la sérotonines, connus pour induire des réactions anxieuses et agressives suite à la variation de leur taux (sécrétion/élimination). Il pourrait également être intéressant de mesurer l'activité cellulaire des structures impliqués dans ces réactions, à savoir l'amygdale, l'hypothalamus et la substance grise périaqueducule par mesure de la protéine c-Fos.

CONCLUSION

Cette étude, en accords avec les précédentes études, permet de mettre en avant les propriétés anxiolytiques du Vératran chez la souris Cd1, et l'absence d'effet myorelaxants, l'un des effets secondaires principales des benzodiazépines. Nous avons mis en lumière de forte augmentation de l'interactions de l'animale avec le centre de la cage. Ces effets sont couplés avec une augmentation du comportement exploratoire chez l'animale illustrée par l'exploration de la sciure présente dans la cage.

Cependant, des recherches complémentaires paraissent nécessaires pour éclairer les processus sous-jacents expliquant les comportements agressifs induit par la prise de cette molécule. L'une des pistes envisagées serait le dosage des stéroïdes comme la testostérone, la progestérone et l'œstradiol plasmatique de la souris, connue pour favoriser ces comportements agressifs.

Zone Périphérique	Nombre de carrés traversés
	Temps passé dans la zone
Zone Centrale	Nombre de carrés traversés
	Temps passé dans la zone
	Latence à entrer dans la zone
Hypercentre	Latence à entrer dans la zone
	Nombre de traversée de la zone
Comportements stéréotypés	Redressements
	Toilettages
	Mictions
	Déféctions

Tableau 1. Récapitulatif des variables mesurées au cours du test Open Field.

Comportements Agonistiques	Boxing
	Morsures ou Tentatives
	Combat
Interactions Sociales	Reniflement Facial
	Reniflement Ano-génital
Intimidation	Poursuite
	Redressements dirigés vers l'intrus
	Vibration de la queue
Comportements Sexuels	Tentatives de monte
Comportements territoriaux	Miction
	Grattage de la sciure

Tableau 2. Récapitulatif des paramètres mesurés au cours des tests Home Intruder et Neutral Cage.