

# Mesure du niveau d'anxiété chez la souris.

Elodie LEVY<sup>1</sup>, Thomas Riquelme<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Master Neurosciences, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup>Master Bioinformatique, Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

## RESUME

*Les souris en territoire inconnue ont tendance à rester blotties contre les parois avant d'oser s'aventurer dans leur nouvel environnement. Le but de cette étude est de tester cette théorie en plaçant une souris dans une boîte et en la filmant pendant 5 minutes. Après analyse de la vidéo, nous montrons que la souris reste dans les coins au début puis appréhende le territoire inconnu et se déplace vers le centre après 3 minutes. L'hypothèse de départ est confirmée par notre expérience, cependant il pourrait être intéressant de la répéter avec la même souris dans d'autres environnements ou avec d'autres souris dans le même environnement afin de donner plus de puissance statistique à notre étude.*

## INTRODUCTION

L'Anxiété peut être définie comme un état psychologique, physiologique et comportemental prolongé lorsqu'une sensation de menace ou de danger est perçue. Le but étant le déclenchement d'un comportement adaptatif face à notre environnement.

Ce trait, bien qu'inscrit au sein de l'éthogramme des mammifères, peut parfois induire ou être associés à de nombreux désordres psychologiques. C'est pourquoi, à l'heure d'aujourd'hui, l'anxiété est à l'origine d'un grand nombre de recherche scientifique visant à l'atténuer principalement par le biais de substance pharmacologique, tels que les anxiolytiques.

De précédentes études ont démontré que des souris considérées comme anxieuses, en territoire neutre et inconnu, ont tendance à montrer une préférence significative pour les lieux plutôt sombre et protégé, à la différence des environnements lumineux les exposant aux prédateurs, et donc présentant un réel danger pour leur survie.

Par le biais de l'expérience effectuée dans cet article, nous cherchons à mesurer le comportement

anxieux chez un sujet non traité et dépourvu d'un quelconque désordre psychologique afin d'obtenir une mesure contrôlée du comportement anxieux chez le rongeur tout en s'appuyant sur la théorie évoquée antérieurement. Pour ce faire, un test comportemental est ici effectué en posant pour hypothèse qu'une souris saine en territoire inconnu aura tendance à se déplacer au plus près des parois et coin sombre avant de s'aventurer au centre d'un nouvel environnement.

## MATERIELS ET METHODES

### Sujet

Afin d'effectuer cette mesure une souris C57BL/6n mâle adulte est utilisée.

### Test comportemental de l'anxiété (Open Field)

Pour cela, nous avons récupéré auprès de Mr Guillou, Enseignant Chercheur en Neurosciences à l'Institut de Neurosciences cognitives et intégratives d'Aquitaine (INICIA), l'enregistrement vidéo<sup>1</sup> d'une expérience comportementale chez la souris.

Ce test permet de mesurer l'anxiété chez un rongeur. Le sujet est placé au centre d'une arène

carré vide et peut ainsi explorer les lieux durant les 5 minutes de la durée du test. Ainsi il nous est possible de mesurer le temps que le sujet passe dans chaque zone de l'open field, tout particulièrement en son centre, afin d'observer l'évolution comportemental de l'anxiété chez une souris saine. De plus, la latence du premier déplacement au centre de l'open field est également prise en compte.

### Traitement de la vidéo

Le déplacement de notre sujet est analysé en nous inspirant des méthodes vu en cours d'imagerie avec Mr Taveau et notamment de l'analyse de la trajectoire du robot dans un labyrinthe<sup>2</sup> dans la vidéo «line maze robot v3 – loop structure maze »<sup>3</sup>.

Les résultats sont présentés sous la forme d'un gradient de couleur représentant les zones où la souris est restée le plus longtemps dans la boîte au cours du test.

### Traitement préalable de la vidéo

La vidéo de 5 minutes a été découpée en cinq tronçons de 1 minute qui seront analysés séparément.

Pour se faire la commande Linux suivante a été utilisée :

```
ffmpeg -i souris.mp4 -vf scale=960:540 -ss 00 -t 60 -r 5 -f image2 Frames/frame%04d.png
```

L'argument -i indique la vidéo à traiter, l'argument -vf scale indique un redimensionnement à une échelle 2 fois inférieure à l'original, -ss indique le début du tronçon, -t indique la durée du tronçon et enfin -r indique le nombre d'image par seconde ou fps.

Chaque minute de la vidéo a ainsi été scindée en une pile de 300 images au format png qui ont ensuite été regroupées en un seul fichier au format tif.

D'autre part, l'image a été rognée au niveau de la boîte de la souris en éliminant la partie

inintéressante de la paillassse grâce à la fonction « crop » du logiciel ImageJ, et ce traitement a été appliqué à l'ensemble de la pile de 300 images.

### Traitement des images

Notre vidéo a l'avantage de posséder un fond uniforme et unicolore plus clair que la souris. Il n'est donc pas nécessaire de soustraire le fond de l'image pour ne récupérer que la souris sur fond noir par l'intermédiaire de la fonction « image calculator : stack - average(stack) » d'ImageJ.

Le premier défaut le plus apparent de notre image est un défaut d'illumination comme on peut le voir sur la Figure 2.A). En effet, la partie droite de l'image est marquée par une ombre et elle est donc plus foncée que le reste. Pour corriger cela, la fonction « subtract background > light background » d'ImageJ a été utilisée. On obtient une image où l'ombre est moins marquée comme on peut le constater sur la Figure 2.B).

Le contraste n'a pas été modifié pour ne pas accentuer l'ombre.

Ensuite, pour corriger les pixels isolés et notamment remplir les oreilles de la souris et effacer la queue pour ne garder que le corps lors de la prochaine étape de seuillage/« threshold », un filtre gaussien a été appliqué. On peut observer le résultat sur la figure 2.C).

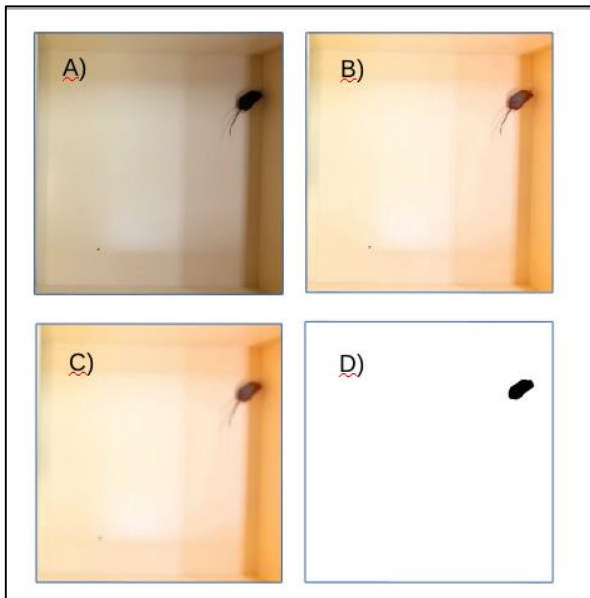
Enfin, l'image a été convertie en 8bit et un threshold de type « minimum » a été appliqué, pour obtenir une image binaire de la souris marqué en noir sur fond blanc (cf Figure 2.D).).

### Récupération des coordonnées de la souris

Pour récupérer les positions x,y du centre de gravité de la souris sur chaque image, les paramètres « centroid » et « stack position » ont été cochés dans la fonction « set measurement » d'ImageJ.

Puis, la pile d'images a été analysée grâce à la fonction « analyze particles » d'ImageJ pour obtenir les positions x,y du centre de gravité de la

souris ainsi que le numéro de l'image correspondant à cette position. Ces résultats ont été enregistrés dans un tableau au format xls.



**Figure 2. Evolution des différents stades de traitement de l'image.** A) Image sans traitement; B) Image avec correction du défaut d'illumination, on remarque que l'ombre a diminué; C) Image après application du filtre gaussien; D) Image binaire après application du "threshold minimum".

### Automatisation des traitements aux autres tronçons

L'ensemble des traitements des images d'une pile suivie de l'extraction des coordonnées de la souris pour cette pile a été enregistré dans un script appelé « script\_traitement.js » pour un tronçon grâce à la fonction « macros > record » d'ImageJ. Puis ce script a été appliqué pour traiter automatiquement les piles d'images des 4 autres tronçons.

### Récupération du nombre d'apparition de la souris dans chaque zone de la boîte avec un script JavaScript

L'image a été découpée en 9 zones représentées sur la figure 3.

Ensuite, les positions x,y de la souris pour chaque image d'un tronçon de 1 minute sont récupérées dans leur tableau xls ouvert dans ImageJ.

Un test a ensuite été appliqué via le script « Trouver\_souris.js » pour vérifier si la position x,y de la souris sur chaque image se trouve entre les bornes x et y (en pixels) d'une zone définie sur la figure 3.

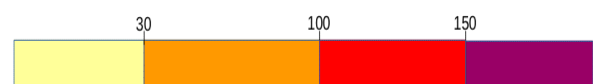
A1	B1	C1
A2	B2	C2
A3	B3	C3

**Figure 3. Découpage de l'image en 9 zones.**

A chaque fois que la position de la souris se trouve dans une zone, un compteur spécifique de la zone est incrémenté. Ces compteurs vont stocker le nombre d'apparition de la souris pour chaque zone (cf script Trouver\_souris.js).

### Affichage des résultats de la présence de la souris pour chaque tronçon sous forme de « hotspot »

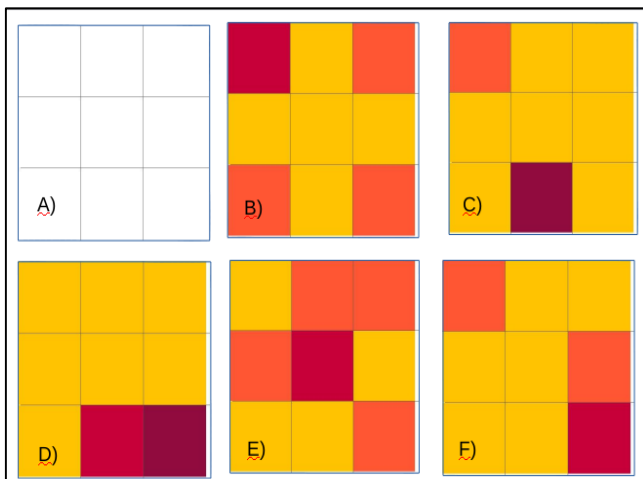
Une image 'template' correspondant à un quadrillage des zones est ouverte dans ImageJ et récupérée par le script « trouver\_souris.js ». Un test du score de chaque zone est ensuite réalisé et les zones de l'image template sont ensuite coloriées en conséquence en suivant un gradient de couleur du jaune au violet schématisé sur la Figure 4.



**Figure 4. Gradient de couleur représentant le nombre d'apparition de la souris.** Les valeurs inscrites au-dessus représentent les valeurs seuils d'apparitions pour chaque couleur.

## RESULTATS

Nous pouvons observer à l'aide de la Figure 1.B. que notre sujet reste majoritairement dans les coins lors de la première minute de test. Puis durant les deuxième et troisième minutes la souris quitte le coin supérieur gauche et reste longtemps auprès de la paroi inférieure (cf Figure 1.C. et 2.D.). Et durant la quatrième minute, le sujet se déplace au sein de plusieurs zones tout en restant longtemps dans la zone centrale. Comme nous pouvons le constater sur la Figure 1.E. Enfin, lors de la cinquième et dernière minute, la souris retourne principalement dans les coins supérieurs gauches et inférieurs droit (cf Figure 1.F).



**Figure 1. Cartes « hotspot » symbolisant les zones où la souris a été le plus présente à chaque minute.** A) Image template; B) Carte de préférence spatiale à la 1ère minute; C) Carte de préférence spatiale à la 2ème minute; D) Carte de préférence spatiale à la 3ème minute; E) Carte de préférence spatiale à la 4ème minute; F) Carte de préférence spatiale à la 5ème minute.

## DISCUSSION

L'hypothèse de départ est confirmée par notre expérience. En effet, la souris a montré dans un premier temps une préférence de place pour les coins de l'open field. Puis, 3 minutes après le début du test, celle-ci a commencé à se déplacer

au sein des 9 zones délimitées dans cet espace, y compris au centre. Cette observation pourrait donc nous permettre d'affirmer que pour une souris saine, le comportement d'anxiété diminue au cours du temps lorsque celle-ci est placée dans un environnement neutre lui étant totalement inconnu. Cependant lors de la dernière minute, la souris retrouve un comportement exploratoire que l'on peut qualifier d'anxieux en montrant une préférence pour les zones aux coins de l'open field.

Cette dernière observation pourrait suggérer une préférence chez la souris pour les zones près des parois, très certainement par instinct de sécurité vis-à-vis des prédateurs.

De plus des mesures statistiques peuvent être faites en supplément, afin d'observer si le temps passé par les sujets au centre de l'open field est significativement plus faible en comparaison au temps passé au sein des zones se trouvant en périphérie des bordures. Malgré un résultat déjà bien orienté (figure 1) dans cette étude.

D'autre part, notre test n'a été effectué qu'une seule fois et sur une seule souris. Il faudrait donc répéter cette expérience sur un groupe de souris plus conséquent afin que nos mesures puissent être validées et utilisées en tant que contrôle pour les expériences à suivre.

En effet, cette étude a pour but d'amorcer une seconde expérience comportementale et pharmacologique afin de tester de nouvelles molécules supposées capables d'atténuer les comportements pathologiques anxieux dans les troubles comportementaux et psychologiques tels que les PTSD. Il s'agit d'un stress post-traumatique caractérisé par l'apparition de trouble anxieux sévère à la suite d'un événement qualifié de traumatisant pour les sujets.

Thomas Riquelme  
Elodie LEVY

Master 1 UE Imagerie

## REFERENCES

<sup>1</sup>Vidéo souris : [http://bfs.u-bordeaux.fr/files/0e64a29986585edb5738bcdcce0c4c25/20150309\\_113923.mp4](http://bfs.u-bordeaux.fr/files/0e64a29986585edb5738bcdcce0c4c25/20150309_113923.mp4)

<sup>2</sup>Script robot, professeur Taveau

<sup>3</sup>Video line maze robot : <https://www.youtube.com/watch?v=9H3fiWP0IE4>