



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

DB 5812

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY I
1994

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTE"

THESE

Présentée et soutenue publiquement
le 20 juin 1994
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE NANCY I
Mention Pharmacologie

par

Henri SCHROEDER
titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies

**EFFETS A COURT ET A LONG TERME D'UN
TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU DIAZEPAM
SUR LA MATURATION
DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL
ET SUR LE COMPORTEMENT DU RAT**



JURY :

Président :

M. P. Vert, Pr, Nancy

Juges :

rapporteur

M. G. Pons, Pr, Paris

rapporteur

M. J. Motte, Pr, Reims

M. B. Krafft, Pr, Nancy

M. P. Nabet, Pr, Nancy

Mme A. Nehlig, DR, Nancy



104 030189 3

à Marianne et Béatrice

REMERCIEMENTS

*Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Unité 272 de l'INSERM
"Pathologie et Biologie du Développement Humain"*

Je remercie en tout premier lieu Monsieur le Professeur P. VERT, Directeur de l'Unité INSERM U272 et Chef de Service de Médecine Néonatale de la Maternité Régionale de Nancy. Je suis très sensible à l'honneur qu'il me fait en acceptant la présidence de ce jury. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir permis de réaliser cette étude. Qu'il me soit permis de le remercier pour l'intérêt qu'il a porté au travail présenté dans ce mémoire.

Je suis très heureux de remercier Madame le Docteur A. NEHLIG, Directeur de Recherche à l'INSERM, qui, tous les jours, par ses conseils et sa passion du travail, m'a dirigé dans cette étude et m'a encouragé. Pour m'avoir initié à la recherche en neurobiologie, qu'elle trouve ici l'expression de toute ma gratitude.

Je tiens à remercier très vivement Monsieur le Professeur J. MOTTE, Professeur au Service de Neurologie Pédiatrique de l'Hôpital d'Enfants du CHU de Reims et Monsieur le Professeur G. PONS, Professeur et Responsable de l'Unité de Pharmacologie Clinique Périnatale et Pédiatrique de l'Hôpital Saint Vincent de Paul à Paris, pour l'honneur qu'ils me font de siéger dans ce jury et pour avoir apporté leurs précieux concours pour juger ce travail.

Mes remerciements s'adressent également à Monsieur le Professeur B. KRAFFT, Directeur du Laboratoire de Biologie du Comportement de la Faculté des Sciences de Nancy, pour son aide à la réalisation de l'étude comportementale en collaboration avec les membres de son laboratoire et pour le temps qu'il a consacré pour juger ce travail.

Je voudrais exprimer à Monsieur le Professeur P. NABET, Chef de Service du Laboratoire de Biochimie A du CHU de Nancy, tous mes remerciements pour avoir accepté de faire partie de ce jury et pour l'intérêt qu'il a porté à cette étude. Je lui suis également très reconnaissant pour m'avoir ouvert les portes de son laboratoire et pour l'aide apportée par son service à la réalisation de ce travail.

C'est avec les Docteurs D. DESOR et A.M. TONIOLO-KULINICZ du Laboratoire de Biologie du Comportement de la Faculté des Sciences de Nancy que j'ai réalisé l'étude de comportement. Je leur suis très reconnaissant pour l'aide et la formation qu'ils m'ont apportées et les remercie très sincèrement pour la gentillesse et la patience qu'ils ont eu à mon égard.

Je remercie également Madame GELOT, Praticien Hospitalier dans le Service de Biochimie du Professeur NABET, pour sa contribution à ce travail en réalisant les dosages d'acides aminés cérébraux.

Ma reconnaissance s'adresse également au personnel de l'Unité INSERM U272, S. BOYET, A.C. HUMBERT et V. KOZIEL pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté tout au long de cette étude ainsi qu'à tous mes camarades et collègues qui m'ont aidé et encouragé tout au long de ces années passées dans le laboratoire.

Je suis également très reconnaissant au Ministère de la Recherche et de la Technologie pour le soutien financier qu'il a apporté à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES



SECTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
1. UTILISATION DES BENZODIAZEPINES.....	1
1.1. Données épidémiologiques	1
1.2. Utilisation clinique	2
1.3. Effets de l'utilisation chronique des BZD chez l'enfant	2
1.3.1. Le risque toxique.....	2
1.3.2. Le risque tératogène.....	3
2. CONSEQUENCES DE L'UTILISATION CHRONIQUE DES BENZODIAZEPINES SUR LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT	4
2.1. Effets sur la croissance corporelle et cérébrale.....	4
2.2. Etudes des récepteurs aux benzodiazépines.....	5
2.3. Etudes neurochimiques	6
2.4. Etudes du métabolisme cérébral et cellulaire	6
2.5. Etudes comportementales	8
2.5.1. Etudes chez l'animal.....	8
<i>a) effets à court terme.....</i>	<i>8</i>
<i>b) effets à long terme</i>	<i>9</i>
2.5.2. Etudes chez l'enfant.....	10
3. MECANISME D'ACTION DES BENZODIAZEPINES	11
3.1. Les récepteurs des benzodiazépines	11
3.1.1. Les récepteurs périphériques.....	11
3.1.2. Les récepteurs centraux.....	11
<i>a) ontogenèse des récepteurs centraux</i>	<i>12</i>
<i>b) les différents sous-types de récepteurs centraux.....</i>	<i>12</i>
3.1.3. Les ligands des récepteurs aux benzodiazépines.....	13
<i>a) différents types de ligands.....</i>	<i>13</i>
<i>b) les ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines</i>	<i>14</i>

3.2. Les récepteurs du GABA	15
3.2.1. La synapse GABAergique.....	15
3.2.2. Le système des récepteurs GABA/benzodiazépines.....	16
<i>a) le récepteur A du GABA.....</i>	<i>16</i>
<i>b) le récepteur B du GABA.....</i>	<i>17</i>
 INTERET DE L'ETUDE.....	 18
 SECTION EXPERIMENTALE.....	 19
 1. TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE DES ANIMAUX ET CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE.....	 19
1.1. Traitement des animaux	19
1.2. Conditions expérimentales.....	20
 2. EVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET CEREBRALES DE DIAZEPAM.....	 21
 3. EFFETS GENERAUX D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU DIAZEPAM.....	 24
3.1. Effets sur la croissance corporelle.....	25
3.2. Effets sur la croissance cérébrale.....	26
3.3. Effets sur la pousse des poils et l'ouverture des yeux	26
 4. DIAZEPAM ET MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL.....	 28
4.1. Evolution du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement postnatal.....	28
4.1.1. Consommation cérébrale d'oxygène	28
4.1.2. Utilisation du glucose comme substrat normal du métabolisme énergétique cérébral	28
<i>a) utilisation du glucose en tant que précurseur de la synthèse des acides aminés cérébraux</i>	<i>29</i>
<i>b) taux régionaux d'utilisation de glucose</i>	<i>29</i>
<i>c) enzymes du métabolisme du glucose</i>	<i>29</i>

4.1.3. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau	30
a) concentrations circulantes et différences artério-veineuses	30
b) utilisation des composés cétoniques en tant que précurseur de la synthèse des acides aminés et des lipides cérébraux	31
c) enzymes du métabolisme des composés cétoniques	31
4.1.4. Régulation de l'utilisation du glucose par les composés cétoniques	32
4.2. Métabolisme des acides aminés	33
4.3. Modifications du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement	34
4.3.1. Maturation cérébrale et vulnérabilité du cerveau immature	34
4.3.2. Modifications du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement : effets de l'hypothyroïdie, de la sous-alimentation et des anticonvulsivants.....	35
<u>Publications</u>.....	38
 <i>"Effects of early chronic diazepam treatment on incorporation of glucose and β-hydroxybutyrate into cerebral amino acids : relation to undernutrition."</i> 	
5. DIAZEPAM ET UTILISATION CEREBRALE LOCALE DE GLUCOSE.....	44
5.1. Théorie de la méthode d'autoradiographie quantitative au 2-désoxyglucose	44
5.1.1. Choix du 2DG-(¹⁴ C)	44
5.1.2. Propriétés biochimiques du 2DG dans le cerveau	44
5.1.3. Description du modèle théorique	46
5.1.4. Equation opérationnelle de la méthode	47
a) le numérateur de l'équation.....	47
b) le dénominateur de l'équation	47
c) les constantes cinétiques	48
d) le facteur de correction pour effet isotopique ou "constante mixte"	48
5.1.5. Considérations théoriques pour la mise en place de la méthode.....	49
5.1.6. Conclusion	50
5.2. Effets des anticonvulsivants sur l'activité fonctionnelle cérébrale	50
<u>Publications</u>.....	53

*"Short- and long-term effects of neonatal diazepam exposure on local cerebral
glucose utilization in the rat."*

6. DIAZEPAM ET DEVELOPPEMENT NEUROMOTEUR.....	57
6.1. Les tests d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat	58
6.1.1. Test de retournement.....	58
<i>a) principe</i>	58
<i>b) protocole</i>	59
6.1.2. Test de réaction anti-gravitaire.....	60
<i>a) principe</i>	60
<i>b) protocole</i>	60
6.1.3. Test de suspension.....	61
<i>a) principe</i>	61
<i>b) protocole</i>	61
6.1.4. Test de coordination locomotrice.....	61
<i>a) principe</i>	61
<i>b) protocole</i>	62
6.2. Effets des BZD sur le développement neuromoteur du rat	63
6.2.1. Exposition prénatale.....	63
6.2.2. Exposition postnatale	64
 <u>Publications</u>.....	 65

"Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to diazepam in rat pups."

7. EFFETS DU DIAZEPAM SUR LE COMPORTEMENT D'EXPLORATION, D'ANXIETE, D'APPRENTISSAGE ET DE MEMORISATION CHEZ L'ANIMAL ADULTE.	68
7.1. Exploration en labyrinthe et mémoire spatiale.....	68
7.1.1. Anatomie de la mémoire	68
7.1.2. Labyrinthe en T.....	69
<i>a) principe</i>	69
<i>b) protocole</i>	70
7.1.3. Labyrinthe à 8 branches	71
<i>a) principe</i>	71
<i>b) protocole</i>	75
7.2. Exploration en labyrinthe et anxiété.....	76
7.2.1. Rôle de l'amygdale dans le comportement d'anxiété.....	76

7.2.2. Boîte à deux compartiments.....	76
a) principe	76
b) protocole	79
7.2.3. Labyrinthe en croix surélevée	80
a) principe	80
b) protocole	82
7.3. Comportement social : situation de contrainte d'accès à la nourriture	83
7.3.1. Principe.....	83
a) stabilité et régulation de la différenciation sociale	84
b) différenciation sociale et anxiété	84
7.3.2. Protocole.....	86
7.4. Exposition chronique précoce aux benzodiazépines : effets à long terme sur le comportement de l'animal adulte.	87
7.4.1. Exposition prénatale.....	87
7.4.2. Exposition postnatale	88
<u>Publications</u>.....	90

"Effects of neonatal administration of diazepam on spatial memory and on social and exploratory behavior of adult male rats."

DISCUSSION.....	102
1. EFFETS DU DIAZEPAM SUR LA CROISSANCE - ROLE DE LA SOUS-NUTRITION	102
2. EFFETS A COURT TERME DU DIAZEPAM SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL ET LE COMPORTEMENT	104
2.1. Concentrations circulantes de glucose et des composés cétoniques	104
2.2. Biosynthèse des acides aminés cérébraux.....	105
2.2.1. Incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux	105
2.2.2. Métabolisme des acides aminés cérébraux.....	106
a) concentrations cérébrales des acides aminés.....	106
b) radioactivités spécifiques - flux dans les différentes voies de synthèse des acides aminés.....	107
2.3. Utilisation cérébrale locale de glucose	108
2.4. Développement neuromoteur	111

3. EFFETS A LONG TERME DU DIAZEPAM SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL ET LE COMPORTEMENT	115
3.1. Effet anxiolytique.....	115
3.2. Effet sur la mémoire.....	119
3.3. Effet myorelaxant	121
3.4. Effet sur les aires sensorielles	122
4. CORRELATION ENTRE LES EFFETS REGIONAUX DU DIAZEPAM SUR L'UTILISATION DE GLUCOSE ET LA LOCALISATION DES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES	122
4.1. Ontogénèse des récepteurs aux benzodiazépines et corrélation avec les effets régionaux du diazépam sur le métabolisme énergétique cérébral	122
4.2. Corrélation entre les effets régionaux du diazépam sur l'utiliation cérébrale de glucose et sur l'ontogénèse des récepteurs aux benzodiazépines	124
5. ROLE DU VEHICULE DE LA PREPARATION INJECTABLE DANS LES EFFETS DU DIAZEPAM SUR LA MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL	125
CONCLUSION GENERALE	128
1. CONCLUSIONS	128
2. COMPARAISON AVEC LES EFFETS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE POSTNATALE AU PHÉNOBARBITAL	129
PERSPECTIVES	131
BIBLIOGRAPHIE.....	133

PRINCIPALES ABREVIATIONS UTILISEES

2DG-(¹⁴C) = 2-désoxyglucose marqué au ¹⁴C

2DG6P = 2-désoxyglucose-6-phosphate

ACA = acétoacétate

AMP = adénosine monophosphate

ARN_m = acide ribonucléique messenger

ATP = adénosine triphosphate

βHB = β-hydroxybutyrate

BZD = benzodiazépines

CDP = chlordiazépoxyde

CLHP = chromatographie liquide haute performance

DE₅₀ = dose efficace 50

DL₅₀ = dose létale 50

DMDZ = N-desméthyldiazépam

DSC = débit sanguin cérébral

DZ = diazépam

G6P = glucose-6-phosphate

GABA = acide gamma-aminobutyrique

PhB = phénobarbital

PG = propylène glycol

PTZ = pentylènetétrazole

RMN = résonance magnétique nucléaire

SNC = système nerveux central

UCLG = utilisation cérébrale locale de glucose

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE



1. UTILISATION DES BENZODIAZEPINES

1.1. Données épidémiologiques

Les benzodiazépines (BZD) sont des molécules appartenant à la classe des anxiolytiques, c'est à dire que ce sont des médicaments psychotropes destinés à traiter les manifestations psychiques et somatiques de l'anxiété pathologique. Les BZD sont caractérisées par leurs propriétés sédatives, anxiolytiques, anticonvulsivantes et myorelaxantes.

Depuis la commercialisation du chlordiazépoxyde (CDP) et du diazépam (DZ) dans les années 60, de nombreuses autres molécules ont été synthétisées, présentant des propriétés pharmacologiques beaucoup plus spécifiques. C'est ainsi qu'à ce jour, près de 50 BZD actives sont disponibles sur le marché (Haefely, 1988).

Parallèlement à cet essor de la chimie des BZD, la consommation d'anxiolytiques n'a cessé de croître dans la plupart des pays occidentaux et souvent en l'absence de tout contrôle médical (Cole et Chiarello, 1990 ; Miller et Gold, 1990). Ainsi, elle serait dans les pays européens de 10 à 30 comprimés par an et par habitant (Bellantuono et coll., 1980) et représente en Suède, par exemple, 88 % de l'ensemble des drogues hypnotiques prescrites par an (Bergman et Dahlström, 1988). Actuellement, cette consommation, qui s'est stabilisée dès la fin des années 70 aux États-Unis, continue d'augmenter en Europe et plus particulièrement en France qui est maintenant le pays du monde où est consommée la plus grande quantité d'anxiolytiques par habitant (Balter et coll., 1974). Une étude récente réalisée sur une période de plus de 6 mois a ainsi montré que, sur un échantillon de 1000 personnes représentatif de la population française, 10 % utilisent des hypnotiques, 6,2 % en consommant fréquemment ou tous les jours (Quera-Salva et coll., 1991). Par ailleurs, une autre étude montre que 11,9 % de la population de la ville de Chambéry déclare souffrir d'insomnies et prendre régulièrement des BZD à visée hypnotique et 6,1 % les utiliser de manière occasionnelle (Ferley et coll., 1988). Une telle consommation, qui est sans doute excessive, fait que les BZD sont maintenant considérées avec l'alcool, la nicotine, la caféine, les opiacées, etc. comme faisant partie d'un ensemble de substances faisant l'objet d'une toxicomanie (Cole et Chiarello, 1990 ; Miller et Gold, 1990). La toxicomanie est définie par l'O.M.S. (1969) comme l'absorption volontaire, abusive, périodique ou chronique, nuisible à l'individu et/ou à la société, d'une

drogue naturelle ou synthétique qui peut être accompagnée de phénomènes de pharmacodépendance (physique ou psychique) et/ou d'accoutumance.

En fait, ce sont surtout les utilisations abusives voire l'autoadministration qui font des BZD des produits potentiellement toxiques. Un arrêté dans ce sens vient d'ailleurs d'être pris en France, dans le but de limiter la durée de prescription des BZD hypnotiques et anxiolytiques.

L'utilisation abusive des BZD touche donc l'ensemble de la population et parmi celle-ci, de nombreuses femmes enceintes, exposant alors le fœtus et le nouveau-né à un certain nombre d'effets indésirables à plus ou moins long terme.

1.2. Utilisation clinique

Cependant, en dehors d'une utilisation abusive, les BZD et plus particulièrement le DZ, leur chef de file, sont prescrites chez la femme enceinte et la femme qui allaite en tant que sédatifs, anxiolytiques et anticonvulsivants dans les cas d'épilepsie. Le DZ est également utilisé en anesthésie au moment de l'accouchement, avant et/ou pendant le travail (Grimm, 1984). Il est également indiqué chez le nouveau-né et le prématuré dans la prévention et le traitement des crises convulsives néonatales et peut même être associé au phénobarbital dans le cas des états de mal (Burdette, 1990 ; Farrell, 1986 ; Vert et Stern, 1985). Le DZ est cependant peu utilisé de manière chronique en néonatalogie du fait d'une tolérance qui se développe très rapidement, phénomène que l'on peut observer pour l'ensemble des BZD (Frey et coll., 1984 ; Yu et coll., 1988).

1.3. Effets de l'utilisation chronique des BZD chez l'enfant

Les BZD sont des molécules de faible poids moléculaire et très liposolubles. Elles traversent donc facilement les membranes biologiques et notamment le placenta, le passage transplacentaire augmentant avec l'âge gestationnel (Kanto, 1982). L'utilisation des BZD comme le DZ pendant la grossesse implique deux types de risques :

1.3.1. Le risque toxique

Lorsqu'elles sont utilisées à la fin de la grossesse, les BZD peuvent être toxiques pour le fœtus et le nouveau-né. En effet, elles traversent facilement la barrière placentaire et peuvent s'accumuler chez l'enfant, surtout au niveau du système nerveux central (SNC), du fait des particularités du métabolisme foetal ou néonatal (Bavoux et coll., 1981).

Sur le plan clinique, l'intoxication aiguë du nouveau-né par les BZD se traduit par une somnolence, une hypotonie, des réflexes diminués, une insuffisance respiratoire avec apnées, des troubles de la thermorégulation et des perturbations du rythme cardiaque. Un tel tableau clinique, désigné sous le terme anglo-saxon de "floppy infant syndrom", qui peut être observé suite à l'administration de BZD à l'approche du terme ou pendant le travail, peut également survenir en cas de prise chronique de BZD tout au long de la grossesse à des doses relativement importantes (Grimm, 1984).

Par ailleurs, un nouveau-né ayant subi une exposition chronique in utero peut également développer après les signes d'intoxication un syndrome de sevrage qui survient en règle générale dans les quelques jours à quelques semaines qui suivent l'accouchement et qui se traduit par une agitation et une hyperexcitabilité et dans des cas extrêmes par des convulsions (Grimm, 1984 ; Levy et Spino, 1993). Ce décalage dans le temps est dû au fait que le métabolisme néonatal et l'excrétion des BZD sont plus lents que chez l'adulte, les capacités d'hydroxylation étant minimes chez le nouveau-né (Bavoux et coll., 1981).

1.3.2. Le risque tératogène

Les résultats des études épidémiologiques concernant le risque tératogène des benzodiazépines, qu'elles soient rétrospectives ou prospectives, restent contradictoires (Bossard et coll., 1987). Cette discordance suggère que le risque tératogène, lorsque des benzodiazépines sont administrées pendant la grossesse, est probablement trop faible pour pouvoir être significativement différent des 2 à 3 % de malformations observées dans la population générale (Bossard et coll., 1987).

Cependant, à la notion classique de tératologie, s'est ajoutée, depuis quelques années, le concept de tératogénèse neurocomportementale. Ce domaine, encore très récent, étudie les effets éventuels des médicaments et des toxiques sur le développement neurocomportemental et psychomoteur des enfants à la suite d'une exposition périnatale. Il n'est pas exclu, en effet, que certains produits puissent avoir un effet néfaste sur la maturation cérébrale et altérer certains processus histologiques et cytochimiques ayant des conséquences fonctionnelles potentiellement graves mais sans pour autant induire des lésions anatomiques décelables (Hutchings, 1982). C'est dans ce cadre que de nombreuses études concernant les effets centraux et périphériques ainsi que les risques de traitement périnatal chronique aux BZD ont été réalisées chez l'animal (Kellogg, 1988 ; Tucker, 1985 pour revue).

D'autre part, il est à noter que les BZD ont également un effet toxique à d'autres niveaux de l'organisme que le SNC. Ainsi, l'administration prolongée de DZ au cours de la gestation provoquent des modifications de la réponse immunitaire cellulaire chez le rat et ce, jusqu'à 8 semaines après la naissance (Schlumpf et coll., 1992, pour revue).

Ces perturbations se traduisent par une réduction de la prolifération lymphocytaire après stimulation mitogénique, une diminution de la libération de TNF_{α} et des interleukines 2 et 6 par les macrophages et les lymphocytes ainsi que du nombre de récepteurs périphériques aux BZD sur les macrophages extraits de préparations de rate. Ces résultats démontrent que les BZD sont susceptibles de provoquer des perturbations à long terme dans les systèmes de communication cellulaire. Ils posent également la question du rôle des récepteurs périphériques aux BZD et des ligands endogènes de ces récepteurs dans le contrôle de l'immunité et de systèmes de régulation comme le système neuroendocrinien.

2. CONSEQUENCES DE L'UTILISATION CHRONIQUE DES BENZODIAZEPINES SUR LE CERVEAU EN DEVELOPPEMENT

2.1. Effets sur la croissance corporelle et cérébrale

Différentes études ont mis en évidence que les BZD administrées en période pré ou postnatale chez l'animal induisent des retards de croissance corporelle (Grimm et Jancourt, 1983 ; Pankaj et Brain, 1991 ; Wang et Huang, 1990). De plus, Grimm et Jancourt (1983) ont montré que le DZ, administré à la rate gestante pendant 18 jours, provoque dans la descendance une diminution plus importante du poids corporel chez les mâles que chez les femelles.

Ces auteurs ont également mis en évidence chez l'animal adulte que le retard de croissance corporelle dû à une administration chronique de DZ s'accompagne d'une hypophagie (Grimm et Jancourt, 1983) alors qu'au contraire, une administration aiguë de BZD induit chez l'animal une hyperphagie dose-dépendante et réversible après administration d'antagonistes ou d'agonistes inverses des récepteurs aux BZD (Cooper, 1985, 1986). Ces travaux mettent ainsi en évidence le rôle potentiel des BZD sur le comportement alimentaire, rôle qui est confirmé par la présence de nombreux récepteurs aux BZD dans l'hypothalamus (Young et Kuhar, 1980).

De même, il a été montré que l'utilisation chronique des BZD en période périnatale induit un retard de croissance cérébrale pouvant aller jusqu'à une réduction de 25 % du poids de certaines structures comme le cervelet (Wang et Huang, 1990).

Au plan histologique, une exposition chronique pré ou postnatale au DZ chez le rat ne semble pas induire de destructions cellulaires mais plutôt des lésions périvasculaires et une prolifération gliale (Frieder et coll., 1984a). L'induction de ces phénomènes prolifératifs par les BZD a également été observée in vitro que ce soit dans des modèles de culture de cellules gliales (Grundt et Rise, 1991) ou de cellules tumorales (Maguire et Regan, 1991).

D'autre part, dans des cultures pures de neurones, le DZ induit un retard dans la croissance des cellules ainsi que des modifications de leur morphologie (Daval et coll., 1988).

De plus, le DZ diminue de manière significative le prélèvement spécifique de 2-désoxyglucose-(³H) et le taux de synthèse des ARN et des protéines, reflétant une diminution du métabolisme cellulaire (Daval et coll., 1988).

2.2. Etudes des récepteurs aux benzodiazépines

Comme les BZD exercent leur action pharmacologique au niveau central en se liant aux récepteurs GABA/BZD, de nombreux travaux ont étudié les conséquences d'une exposition chronique précoce aux BZD sur l'ontogenèse, la fonctionnalité et la biologie moléculaire de ces récepteurs.

Ainsi, un traitement chronique au DZ qu'il soit pré ou postnatal, n'a aucun effet significatif sur la densité et l'affinité des récepteurs aux BZD mesurées sur des préparations membranaires obtenues chez des animaux âgés de 0 à 35 jours (Kellogg et coll., 1983 ; Massotti et coll., 1980 ; Rothe et Bigl, 1989).

Par contre, sur des préparations membranaires obtenues chez des rats âgés de 60 et 90 jours, les résultats des différentes études réalisées à ce jour sont variables en fonction de la période de traitement et de la dose utilisée. Ainsi, dans certains cas, un traitement prénatal au CDP (10 mg/kg/jour, 4ème au 21ème jour de gestation) ou au DZ (5,0 à 7,5 mg/kg/jour, 15ème au 20ème jour de gestation) induit une diminution de la densité des récepteurs aux BZD sans que leur affinité soit modifiée (Avnimelech-Gigus et coll., 1986 ; Livezey et coll., 1986a, 1986b) alors que dans d'autres cas, le nombre et l'affinité des récepteurs ne sont pas perturbés après administration de DZ à la dose de 2,5 mg/kg/jour au cours de la dernière semaine de gestation (Kellogg, 1988).

D'autre part, après un traitement au DZ (1 mg/kg/jour) du 7ème au 20ème jour de vie postnatale, le nombre des récepteurs aux BZD mesuré dans le cervelet chez des animaux âgés de 90 jours est comparable à celui observé chez les témoins (Rothe et Bigl, 1989) alors que Shibuya et coll. (1986) montrent une augmentation de la densité des récepteurs au même âge après une exposition chronique au DZ du 1er au 10ème jour de vie postnatale mais à la dose de 20 mg/kg/jour.

Au plan moléculaire, un traitement chronique au DZ induit au niveau cortical une diminution des taux d'ARN_m codant pour la sous-unité α_1 du récepteur GABA_A sans qu'il y ait de modification de la quantité d'ARN_m codant pour la sous-unité β_1 (Heninger et coll., 1990). De la même façon, chez des souris traités du 1er au 28ème jour de vie postnatale avec du lorazépam (2 mg/kg/jour), Kang et Miller (1991) mettent en évidence un abaissement significatif des concentrations d'ARN_m codant pour les sous-unités α_1 et γ^2 du récepteur GABA_A dans le cortex à partir du 14ème jour de traitement. Par contre, dans ces 2 études, aucune modification n'a été enregistrée dans l'hippocampe et le cervelet.

Ces modifications dans la structure moléculaire du complexe récepteur GABA_A pourraient être liées à la diminution de la sensibilité de ce récepteur vis-à-vis du GABA qui est observée dans le cas d'un traitement chronique au DZ (Gallager et coll., 1984, 1985).

2.3. Etudes neurochimiques

Différents travaux portant sur les effets à long terme d'une exposition périnatale aux BZD sur les principaux systèmes de neurotransmission du SNC ont mis en évidence une diminution de la concentration, des taux de renouvellement et de la libération de la noradrénaline dans l'hypothalamus sans conséquences sur l'innervation noradrénergique du cortex et de l'hippocampe (Kellogg et Retell, 1986 ; Ryan et Pappas, 1986 ; Simmons et coll., 1984a) ainsi que des modifications de la concentration et du prélèvement cellulaire de l'acétylcholine, de la sérotonine et du GABA dans le cortex et l'hippocampe (Frieder et Grimm, 1985). Par ailleurs, une exposition périnatale au DZ n'induit aucune perturbation des taux de renouvellement de la dopamine mesurés chez l'animal adulte à l'état basal à l'exception d'une diminution dans le noyau accumbens et l'aire tegmentale ventrale (Deutch et coll., 1989 ; Gruen et coll., 1990). Par contre, une administration aiguë de DZ induit dans le cortex et le striatum des modifications significatives et dose-dépendantes des concentrations d'acide homovanillique, le précurseur de la biosynthèse de la dopamine (Bowers et coll., 1991).

D'autre part, des modifications des taux tissulaires de différents acides aminés neurotransmetteurs comme l'aspartate, le glutamate, la glycine ou le GABA ont été observées chez des rats âgés de 7, 21 et 60 jours et traités avec du clonazépam au cours de la période périnatale (Hannah et coll., 1989).

Ces différentes études montrent donc qu'il existe une relation étroite entre la liaison des BZD aux récepteurs GABA/BZD et la régulation des systèmes de neurotransmission comme le système noradrénergique ou dopaminergique.

2.4. Etudes du métabolisme cérébral et cellulaire

La mesure des taux de métabolisme cérébral est une des méthodes les plus représentatives de l'évaluation de l'activité fonctionnelle cérébrale (Sokoloff, 1982). La tomographie d'émission de positons chez l'homme ou la technique d'autoradiographie quantitative au 2-désoxyglucose-(¹⁴C) (2DG-(¹⁴C)) chez l'animal permettent de visualiser simultanément les taux de métabolisme dans l'ensemble des structures cérébrales d'un même individu et d'aborder ainsi de manière globale le fonctionnement du SNC.

Ces techniques ont bien sûr été utilisées pour étudier les effets des BZD sur l'activité fonctionnelle cérébrale. Il a ainsi été démontré que des traitements aigus ou chroniques au DZ

administrés à des rats adultes dépriment les taux d'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) dans un grand nombre de structures cérébrales (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Laurie et Pratt, 1989 ; Nehlig et coll., 1987). Cependant, l'administration chronique de DZ induit des diminutions des taux d'utilisation de glucose dans un nombre plus limité de structures et dans des régions différentes par rapport à un traitement aigu ou subchronique (Ableitner et coll., 1985 ; Laurie et Pratt, 1989), suggérant le développement d'une tolérance vis à vis du traitement et des modulations du rôle de certaines structures dans ces mécanismes de tolérance par rapport aux différentes propriétés pharmacologiques du DZ.

Des études ont confirmé chez l'homme les résultats obtenus chez l'animal. Ainsi, avec le technique de tomographie par émission de positons utilisant le fluorodésoxyglucose-(¹⁸F) comme traceur, De Wit et coll. (1991) ont montré qu'une injection aiguë de DZ à 2 doses différentes chez des volontaires sains provoque par rapport à l'administration d'un placebo une diminution significative des valeurs de métabolisme dans l'ensemble des structures cérébrales étudiées. D'autre part, Foster et coll. (1987) observent le même type de résultats en utilisant du DZ à dose sédatrice chez des patients présentant une maladie d'Alzheimer.

Le débit sanguin cérébral (DSC), du fait de son couplage avec le métabolisme (Kuschinsky, 1982 ; Sokoloff, 1981), est également considéré comme un bon index de l'activité fonctionnelle cérébrale. Les effets du DZ sur le DSC ont également été étudiés et montrent des diminutions identiques à celles observées dans les études de métabolisme tant chez l'homme (Mathew et Wilson, 1991 ; Mathew et coll., 1992) que chez l'animal (Lasbennes et Seylaz, 1986).

D'autre part, il a été démontré chez l'animal qu'une exposition chronique au DZ in utero peut perturber le métabolisme cellulaire. Ainsi, les taux tissulaires de malonyldialdéhyde, un marqueur de l'activité métabolique intracellulaire, mesurés dans différentes régions du cerveau chez des rats âgés de 3, 18 et 24 mois sont modifiés par l'administration chronique de DZ aux doses de 1 et 2,5 mg/kg au cours de la dernière semaine de gestation (Kellogg, 1988). Les résultats de cette étude ont amenés les auteurs à suggérer que les récepteurs aux BZD seraient impliqués dans la mise en place du métabolisme cellulaire et que ce rôle pourrait être modulé avec l'âge (Kellogg, 1988). Par ailleurs, des mesures faites en RMN montrent une diminution du pH intracellulaire et de l'utilisation de la phosphocréatine en tant que précurseur de l'ATP chez des animaux soumis à un traitement périnatal au DZ (Miranda et coll., 1990). L'utilisation d'autres ligands que le DZ et d'antagonistes des récepteurs aux BZD dans cette étude a permis de confirmer le rôle de ces récepteurs dans la régulation du métabolisme cellulaire et de montrer qu'il existe, au cours du développement, une interaction entre les récepteurs centraux et périphériques aux BZD et l'organisation de l'activité neuronale.

2.5. Etudes comportementales

2.5.1. Etudes chez l'animal

Différents travaux montrent qu'une exposition chronique aux BZD pendant la période pré ou postnatale chez l'animal provoque des modifications du comportement au cours du développement et au stade adulte.

a) effets à court terme

Une exposition prénatale au CDP induit chez la souris un allongement du temps de retournement, une réaction de retrait face au vide plus lente et un retard dans la maturation du réflexe d'enfouissement (Kurishingal et coll., 1992 ; Pankaj et Brain, 1991) alors que le DZ, qu'il soit administré en période pré ou postnatale, ne provoque pas de modifications du réflexe de retournement mesuré chez des rats âgés de 5 jours (Frieder et coll., 1984a ; Gai et Grimm, 1982).

Le développement postnatal chez le rat est caractérisé sur le plan comportemental par une courte période d'hyperactivité locomotrice vers le 14-15ème jour de vie suivie d'une brusque diminution de cette activité vers le 17ème jour (Campbell et coll., 1969). Plusieurs études ont ainsi mis en évidence une diminution de cette hyperactivité chez des animaux soumis à une exposition prénatale au DZ (Cagiano et coll., 1990 ; Kellogg et coll., 1980 ; Shore et coll., 1983). Par ailleurs, Kellogg et coll. (1980) ont montré que le DZ administré en période prénatale interfère avec le développement d'une réaction de sursaut au bruit. Ce comportement, qui peut être observé dès le 12ème jour de vie postnatale chez l'animal témoin et qui est alors comparable à celui constaté chez l'adulte, n'est, par contre, pas encore bien défini à 20 jours chez des animaux traités avec du DZ. De plus, contrairement à ce qui est enregistré chez les témoins, aucune potentialisation de la réponse en fonction de l'intensité du bruit n'est observée chez les rats préexposés au DZ. Ces auteurs ont également observé une baisse de l'acuité auditive temporelle à partir de 28 jours d'âge postnatal et persistant jusqu'à 70 jours chez des rats qui ont subi une exposition prénatale au diazépam (Kellogg et coll., 1983).

Ces différents résultats suggèrent que le DZ administré pendant la dernière semaine de gestation chez le rat, c'est à dire pendant une phase de différenciation neuronale intense, induit probablement des perturbations de la maturation de certaines structures cérébrales impliquées dans les processus d'éveil des jeunes animaux au travers de comportements de type réflexe ou non.

D'autre part, il a été démontré que le CDP et le DZ induisent une diminution des cris ultrasoniques de détresse émis par des jeunes rats séparés de leur mère sans qu'il y ait modification de l'activité locomotrice des animaux, traduisant un effet anxiolytique des BZD chez l'animal immature (Engel et Hard, 1987 ; Gardner, 1985 ; Insel et coll., 1986) et le rôle que le complexe récepteur GABA/BZD jouerait dans les mécanismes physiologiques sous-jacents à l'émission de ces cris (Insel et coll., 1986). Plus récemment, différentes études ont montré qu'une exposition prénatale au DZ ou au CDP induit des modifications de la durée de ces cris de détresse chez le rat ou la souris pendant les 2 premières semaines de vie postnatale (Cagiano et coll., 1990 ; Kurishinal et coll., 1992) alors qu'un traitement postnatal au diazépam n'a pas d'effet significatif sur l'émission de ces cris (File, 1986a).

Ces résultats suggèrent un effet possible des BZD sur la maturation des structures cérébrales intervenant dans ce type de comportement via les récepteurs GABA/BZD. D'autre part, ces modifications ont certainement des conséquences sur le comportement des animaux au sein d'une même portée ainsi que sur l'attitude de la mère vis-à-vis de ses petits avec pour conséquence un comportement anormal des animaux à l'âge adulte (Cagiano et coll., 1990).

b) effets à long terme

Chez l'animal adulte, une exposition chronique précoce aux BZD n'induit peu ou pas de modifications de l'activité locomotrice et du comportement d'exploration que ce soit dans des tests d'open field ou de planche à trous (Barbier et coll., 1991 ; File, 1986b, 1986c ; Gai et Grimm, 1982). Seule, l'étude de Frieder et coll. (1984a) met en évidence une augmentation du nombre de carrés traversés et du nombre de redressements dans un open field chez des animaux de 35 jours traités avec du DZ (10 mg/kg/jour) entre le 3ème et le 18ème jour de vie postnatale. D'autre part, les BZD administrées pendant les premières semaines suivant la naissance provoquent une diminution des performances des animaux adultes dans les tests d'exploration en labyrinthe (Laviola et coll., 1992 ; Livezey et coll., 1986b ; Marczynski et coll., 1988) soulignant des déficits possibles dans la mémoire spatiale et des altérations au niveau de l'hippocampe bien que Livezey et coll. (1986b) attribuent plutôt ces déficits à un état chronique d'hyperexcitabilité et à un manque d'attention généré par l'exposition chronique précoce au DZ.

L'administration précoce de BZD induit également chez l'animal adulte une baisse des performances dans des tests de mémorisation. Ainsi, dans un labyrinthe à 6 branches où l'animal doit faire un choix discriminant en fonction de la couleur des branches pour trouver de l'eau, le DZ induit une augmentation du nombre d'erreurs par rapport aux témoins que ce soit pendant la phase d'acquisition ou de mémorisation (Frieder et coll., 1984a ; Gai et Grimm, 1982). De même, les test d'évitement passif font apparaître un déficit de la mémorisation à long terme chez des animaux traités en période postnatale avec différentes BZD (File, 1986a, 1986b).

Enfin, il a été observé, chez l'animal adulte, qu'un traitement chronique précoce au DZ a pour conséquence une augmentation des interactions sociales, une diminution de la peur ressentie par l'animal lors de son insertion dans une communauté étrangère de rats et une augmentation de l'agressivité envers les intrus provenant d'une autre communauté, suggérant un possible effet anxiolytique à long terme des BZD (File et Tucker, 1983 ; File, 1986a, 1986c). De même, des modifications du comportement sexuel traduisant des troubles de la motivation et de l'émotion face à certaines situations environnementales ont pu être notées chez des animaux adultes qui ont subi une exposition précoce au DZ (Cagiano et coll., 1990).

2.5.2. Etudes chez l'enfant

L'ensemble des études faites chez l'animal indique qu'une exposition chronique précoce aux BZD provoque des modifications biochimiques, histologiques et comportementales à court et à long terme. Ces données sont confirmées par les résultats d'études concernant le développement de nouveau-nés humains ayant subi une exposition aux BZD in utero qui font apparaître des retards du développement neurologique, intellectuel et comportemental de ces enfants (Laegreid, 1990 ; Laegreid et coll., 1989, 1992a, 1992b).

Ainsi, à la naissance, le poids, la taille et le périmètre crânien des enfants exposés in utero aux BZD sont significativement plus faibles que ceux mesurés dans la population témoin (Laegreid, 1992a). Dix-huit mois après la naissance, le poids de ces enfants est devenu comparable à celui observé chez les témoins alors que la taille et le périmètre crânien restent toujours significativement diminués (Laegreid et coll., 1992b).

D'autre part, le nombre de complications périnatales, notamment d'ordre cardiorespiratoire, est significativement plus élevé dans le groupe des nouveau-nés exposés aux BZD que dans le groupe témoin (André et coll., 1973 ; Laegreid et coll., 1992a). André et coll. (1973) ont ainsi observé que l'administration de DZ au cours de la grossesse induit chez l'enfant une dépression neurologique entraînant des troubles de la commande respiratoire qui nécessitent une réanimation dès la naissance, dans la moitié des cas.

La prise chronique de BZD au cours de la grossesse a pour conséquence un retard général du développement neuromoteur qui se traduit à la naissance par une diminution du tonus musculaire et des réflexes (Laegreid et coll., 1992a). Ce retard persiste jusqu'à l'âge de 10 mois où des troubles significatifs de la posture et de la motilité ont été observés par rapport aux témoins (Laegreid et coll., 1992b). A 18 mois, les enfants exposés in utero aux BZD présentent un comportement neuromoteur qui est comparable à celui observé dans la population témoin à l'exception de troubles de la prise volontaire d'objets avec la main, révélateurs d'un retard probable de maturation au niveau cortical (Laegreid et coll., 1992b).

Il est à noter, dans ces différentes études, que la prise chronique de BZD en période prénatale à des doses relativement faibles n'induit pas de malformations majeures mais une dysmorphie dans 29 % des cas contre 7 % dans la population témoin. Par contre, à des doses plus massives, les BZD peuvent induire des troubles malformatifs plus importants ainsi qu'un retard mental (Laegreid, 1990 ; Laegreid et coll., 1989 ; Volpe, 1987).

3. MECANISME D'ACTION DES BENZODIAZEPINES

Le mécanisme d'action qui est à la base de l'ensemble des propriétés pharmacologiques des BZD a été établi grâce à la découverte des sites de liaison spécifiques au niveau central (Möhler et Okada, 1977 ; Squires et Bastrup, 1977) et la mise en évidence de leurs interactions avec le système GABAergique (Haefely, 1975 ; Morrow et Paul, 1988).

3.1. Les récepteurs des benzodiazépines

Dès leur découverte, il est apparu que le taux d'occupation des sites par les BZD était directement en rapport avec leurs effets pharmacologiques (Squires et Bastrup, 1977). C'est ainsi qu'il existe une excellente corrélation entre les taux d'occupation des récepteurs des BZD et la protection vis-à-vis de crises convulsives induites par le pentylènetétrazole (PTZ).

En fait, il existe au niveau du SNC deux types de récepteurs aux BZD.

3.1.1. Les récepteurs périphériques

Ces récepteurs sont essentiellement présents dans des tissus autres que le tissu nerveux comme les plaquettes sanguines, le poumon, le foie, le rein, le coeur et les testicules. Au niveau central, ils sont présents en petite quantité. Ils sont localisés uniquement dans les cellules gliales, plus précisément au niveau des mitochondries. Il semble qu'ils ne jouent aucun rôle dans l'action pharmacologique des BZD. Cependant, l'activation de ces récepteurs a pour conséquence des effets aussi divers que l'augmentation de la conversion du cholestérol en prégnénolone, l'inhibition de la prolifération cellulaire, la modulation de la production de cytokines, la régulation de l'activité cardiaque ou l'apparition d'un état proconflictuel et anxiogène (Gavish et coll., 1992 ; Papadopoulos, 1992).

3.1.2. Les récepteurs centraux

Des études réalisées chez le rat ont montré que ces sites sont localisés sur les neurones et qu'ils doivent être couplés à un sous-type du récepteur GABA_A pour permettre l'action pharmacologique des BZD (Morrow et Paul, 1988) (*figure 1*).

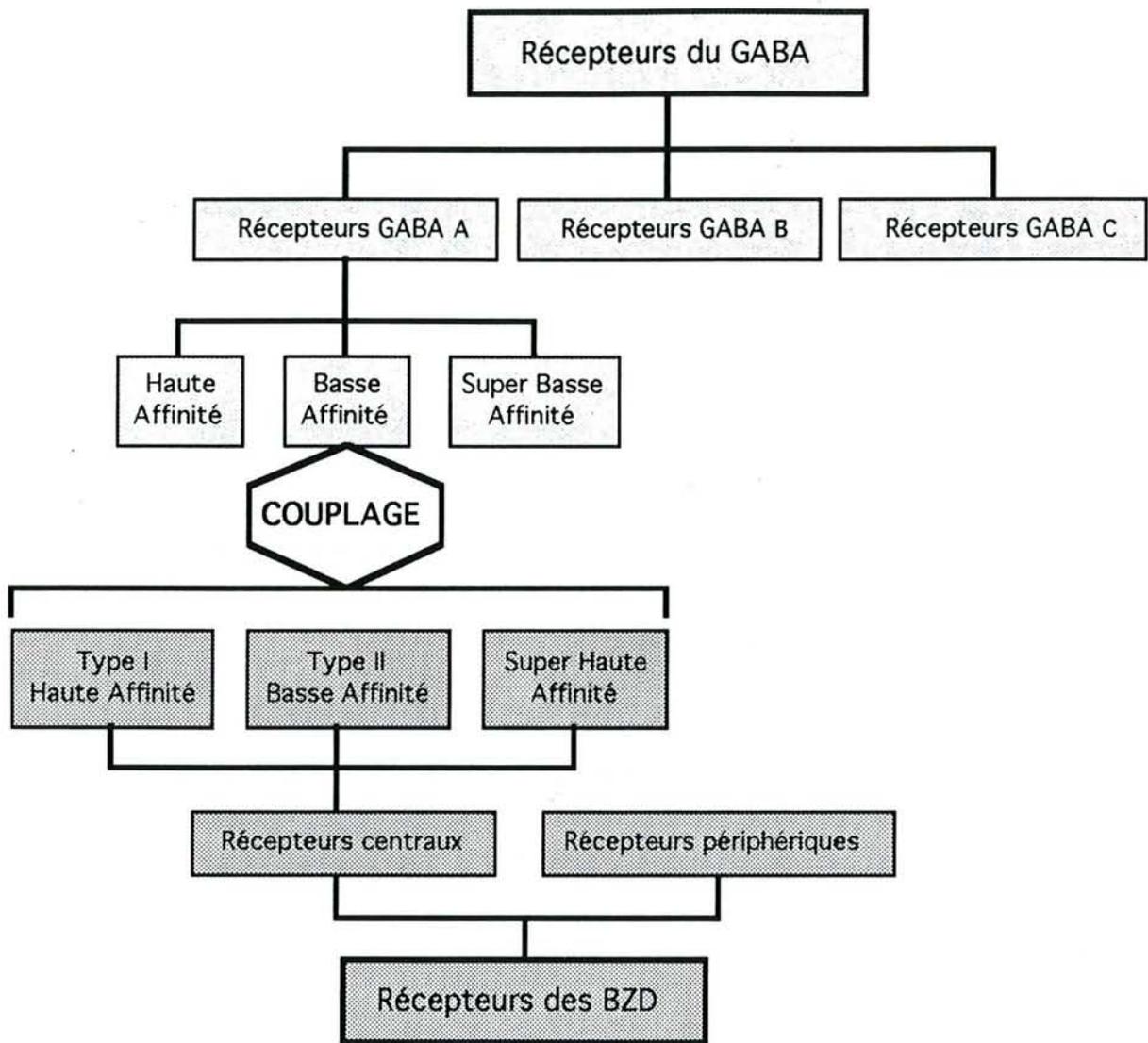


figure 1. Hétérogénéité des récepteurs GABA et des récepteurs benzodiazépines (d'après Bacon et Viennot, 1990)

Il existe deux types de récepteurs GABA, le récepteur GABA_A et le récepteur GABA_B qui se distinguent par leur mode d'association à un canal ionique. Le récepteur GABA_A est lui-même constitué de trois sous-classes d'affinité différente. Les études autoradiographiques et immunohistologiques ont montré que les récepteurs GABA_A et benzodiazépines ne sont pas systématiquement présents simultanément dans une même zone et que ce sont les récepteurs GABA_A à basse affinité qui sont impliqués lorsqu'il y a couplage.

Les récepteurs benzodiazépines sont classés en sites "centraux" (neuronaux) et "périphériques" (gliaux). Les récepteurs benzodiazépines centraux se divisent eux-même en trois sous-groupes en fonction des affinités de leurs ligands spécifiques. Ces sous-types présentent des différences régionales dans leur association avec le récepteur GABA_A.

a) ontogenèse des récepteurs centraux

De nombreuses études faites chez le rat adulte (Young et Kuhar, 1980), chez l'animal immature (Aldinio et coll., 1981 ; Daval et coll., 1991) et chez l'homme (Frey et coll., 1991 ; Young et Kuhar, 1979) ont montré que la répartition de ces sites centraux dans le SNC est hétérogène mais reste comparable à celle des récepteurs GABA_A de basse affinité, les régions les plus riches étant principalement le cortex, le thalamus, l'hippocampe, l'hypothalamus et la couche moléculaire du cervelet. Sur le plan du développement, des récepteurs aux BZD apparaissent dès le début de la troisième semaine de gestation chez le rat (Baestrup et Nielsen, 1978) et après 12 semaines d'âge gestationnel chez l'homme (Aaltonen et coll., 1983). Chez le rat, les récepteurs présents à la naissance représentent environ 35 % du nombre de sites de liaison mesurés chez l'animal adulte. Ce nombre de récepteurs augmente avec l'âge dans l'ensemble des structures cérébrales, spécialement entre 5 et 15 jours pour atteindre à ce stade les valeurs observées chez l'adulte (Aldinio et coll., 1981 ; Daval et coll., 1991). De plus, ces études ont montré que ces récepteurs aux BZD sont fonctionnels et sensibles à l'action du GABA dès leur apparition dans le SNC.

b) les différents sous-types de récepteurs centraux

Il existe plusieurs sous-types de récepteurs centraux aux BZD qui ont été différenciés en fonction de leur affinité pour différents ligands comme les β -carbolines et les triazolopyridazines. On distingue ainsi les récepteurs de type I à haute affinité (nanomolaire) et les récepteurs de type II à basse affinité (micromolaire) (Bacon et Viennot, 1990 ; Dennis et coll., 1988 ; *figure 1*). D'autre part, l'existence d'un récepteur à super haute affinité (picomolaire) dont la finalité reste à déterminer a été proposée récemment (Bacon et Viennot, 1990).

La densité des récepteurs de type I et II varie selon les régions du cerveau. Ainsi, chez le rat adulte, 90 % des récepteurs de type I sont localisés dans le cervelet alors que les récepteurs de type II sont fortement exprimés dans les couches superficielles du colliculus supérieur et le striatum. Dans le reste du cerveau, les deux types de récepteurs coexistent, plus particulièrement dans le cortex et l'hippocampe.

Chez le rat et la souris, les récepteurs de type II sont prédominants à la naissance. Puis, avec l'âge, la densité des récepteurs de type I augmente pour devenir majoritaire et atteindre les valeurs observées chez l'adulte à partir du 22^{ème} jour de vie postnatale (Bacon et coll., 1991 ; Chrisholm et coll., 1983 ; Garitt et Tabakoff, 1985 ; Lippa et coll., 1981).

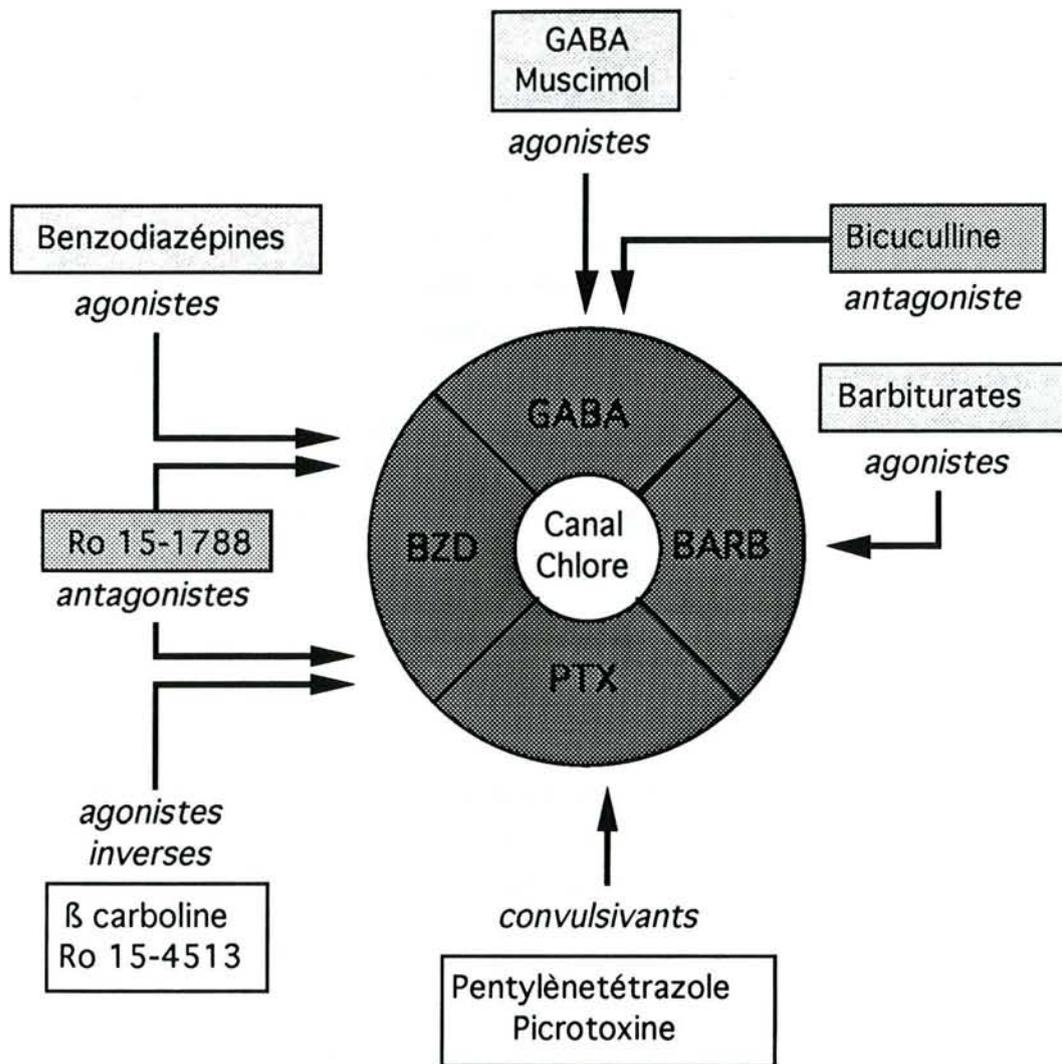


figure 2. Les différents sites de fixation de plusieurs types de ligands sur le complexe récepteur GABA_A/benzodiazépine (d'après Bacon et Viennot, 1990).
 BARB : barbiturates; BZD : benzodiazépine; PTX : picrotoxine.

Le fait que les BZD induisent, chez le rat nouveau-né âgé de 4 jours, une hyperactivité et des manifestations comportementales de type convulsions, suggère que les BZD pourraient avoir une action qualifiée de "proconvulsivante" en agissant au niveau des récepteurs de type II (Barr et Lithgow, 1983 ; File et Wilks, 1986). Il est cependant à noter que les crises provoquées par les BZD diffèrent de celles induites par des agents convulsivants comme la picrotoxine ou le PTZ par l'absence de convulsions tonico-cloniques (File et Wilks, 1986). D'autre part, l'administration au même âge de CL 218872, un agoniste inverse spécifique des récepteurs de type I, n'induit aucune des manifestations comportementales observées avec les BZD confirmant que le ou les mécanismes sous-jacents aux crises provoquées par les BZD impliquent bien les récepteurs de type II (File et Wilks, 1986). L'ensemble de ces résultats laisse à penser que l'action stimulante des BZD au niveau central serait médiée par les récepteurs de type II et les effets sédatifs par les récepteurs de type I. De plus, cela permettrait d'expliquer pourquoi, chez l'animal adulte, l'action sédatrice des BZD prédomine sur les effets stimulants, les récepteurs de type I étant alors plus nombreux que ceux de type II.

3.1.3. les ligands des récepteurs aux benzodiazépines

a) différents types de ligands

Il existe un large spectre de ligands pouvant se lier au site de fixation BZD du complexe [récepteur GABA_A/récepteur BZD/canal chlore]. Ceux-ci peuvent être classés en 3 catégories en fonction de l'effet physiologique déclenché par la liaison du ligand sur le récepteur (Bacon et Viennot, 1990) (*figure 2*).

1) les ligands dits **agonistes**. Ils reproduisent parfaitement l'effet des BZD classiques type CDP et agissent en facilitant l'action du GABA sur le canal chlore. C'est le cas du DZ et de toutes les BZD actuellement sur le marché.

2) les ligands dits **antagonistes**. Ceux-ci se fixent bien sur le récepteur BZD mais ils sont totalement dépourvus des propriétés tranquillisantes ou anticonvulsivantes attendues. Ils ne modifient pas l'activité du GABA sur le canal chlore et n'ont donc aucun effet propre. Le seul antagoniste connu est le Ro 15-1788 ou flumazénil qui trouve aujourd'hui des applications en clinique en tant qu'antidote en cas de surdosage en BZD.

3) les ligands dits **agonistes inverses**. Il s'agit de composés appartenant à la famille des β -carbolines qui sont capables de se lier au récepteur BZD et de produire des effets exactement inverses à ceux des tranquillisants comme le DZ. Ces molécules agissent en déprimant l'action du GABA au niveau du canal chlore et ont ainsi des effets anxiogènes et convulsivants.

b) les ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines

L'existence de sites de liaison spécifiques pour les BZD a conduit plusieurs équipes à rechercher la présence de ligands endogènes de ces récepteurs.

Une famille de peptides endogènes appelés endozépines en raison de leur capacité à déplacer les BZD de leurs sites de liaison a été ainsi identifiée (Tonon et coll., 1994).

Toutes les endozépines connues à ce jour dérivent d'un polypeptide appelé Diazepam Binding Inhibitor initialement isolé à partir du cerveau de rat.

Les endozépines sont largement distribuées dans l'ensemble du SNC et dans de nombreux tissus périphériques, les concentrations les plus fortes étant mesurées au niveau central, dans l'hypothalamus et le cervelet, et au niveau périphérique, dans le foie, le rein et le duodénum.

La plupart des effets biologiques des endozépines s'exercent par l'intermédiaire, soit des récepteurs centraux des BZD associés au site GABA_A, soit des récepteurs périphériques, où elles modulent négativement la transmission GABAergique. Les endozépines sont donc des agonistes inverses des BZD, ayant des propriétés inhibitrices qui sont à la base de leurs effets anxiogènes et convulsivants comparables à ceux observés après l'injection de β -carboline (Tonon et coll., 1994). Izquierdo et Medina (1991) ont ainsi proposé l'existence d'un équilibre entre substances endogènes agonistes des récepteurs des BZD et endozépines qui interviendrait dans le contrôle de l'anxiété et les mécanismes d'apprentissage.

D'autre part, les endozépines, via l'activation des récepteurs périphériques des BZD, jouent un rôle clé dans les premières étapes de la biosynthèse des stéroïdes. Or, il est maintenant établi que les neurostéroïdes sont capables de moduler positivement ou négativement le fonctionnement du récepteur GABA_A (Puia et coll., 1992). Ainsi, il est possible qu'au niveau central, les endozépines puissent moduler la transmission GABAergique en contrôlant la biosynthèse des stéroïdes.

En conclusion, les endozépines constituent une famille de peptides qui présentent différentes activités biologiques mais dont les fonctions physiologiques et les modes d'action restent mal connus. Les travaux récents indiquent que les endozépines pourraient agir à la fois comme des messagers intercellulaires et des médiateurs intracellulaires et auraient principalement un rôle de régulation, notamment du système neuroendocrinien (Tonon et coll., 1994).

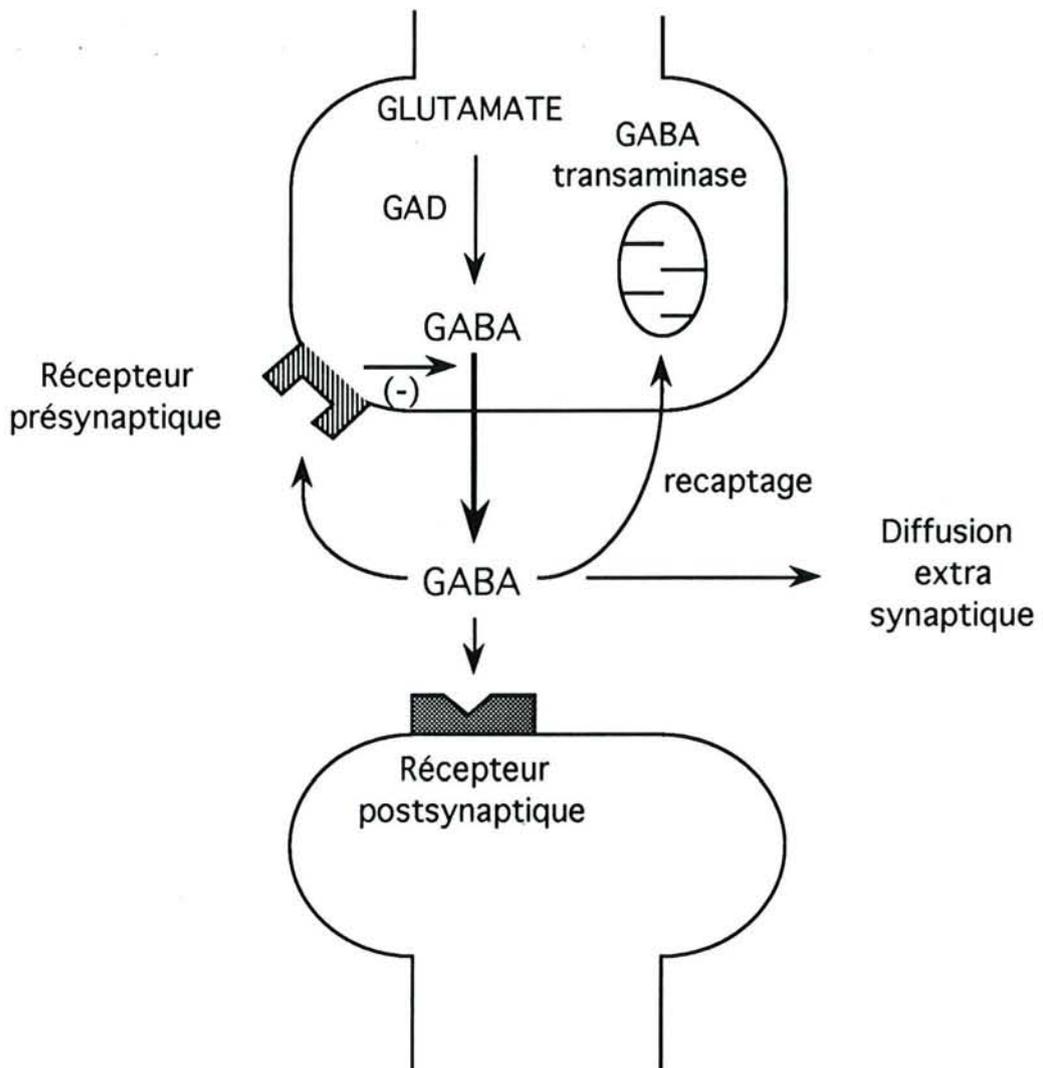


figure 3. Représentation schématique de la transmission GABAergique (d'après Bourin et Hascoet, 1992). GAD : glutamate décarboxylase.

3.2. Les récepteurs du GABA

Le GABA est le neurotransmetteur inhibiteur le plus important du SNC. Il est présent dans l'ensemble du cerveau et agit sur environ 30 à 40 % des synapses du SNC (Matsumoto, 1989).

On trouve peu de neurones GABAergiques du type neurone de projection avec un axone long. Ce groupe est essentiellement représenté par les cellules de Purkinje localisées dans le cortex cérébelleux qui projettent vers des noyaux profonds et les neurones de la voie GABAergique striato-nigrée.

Par contre, les neurones GABAergiques du type interneurone avec un axone court sont très nombreux. Ils sont localisés essentiellement au niveau de la moelle, du cervelet (inhibition des cellules de Purkinje par les cellules en étoile), du striatum et du cortex cérébral où ils régulent l'excitabilité corticale.

3.2.1. La synapse GABAergique (Bourin et Hascoet, 1992) (*figure 3*)

Le GABA est un acide aminé neutre formé par décarboxylation de l'acide glutamique grâce à une enzyme, la glutamate décarboxylase. Le GABA est stocké comme d'autres neurotransmetteurs dans des vésicules synaptiques et libéré dans la fente synaptique.

Au niveau de l'espace synaptique, le GABA peut interagir avec des récepteurs GABAergiques post-synaptiques et peut également se fixer à des récepteurs pré-synaptiques dont le rôle est de régulariser la libération de GABA dans la synapse. Ce neurotransmetteur a également tendance à diffuser en grande quantité hors de la synapse et à étendre son activité inhibitrice à d'autres neurones de l'environnement.

L'inactivation du GABA a lieu essentiellement par recaptage intracellulaire dans les terminaisons pré-synaptiques et les cellules gliales où il est dégradé par la GABA-transaminase en semi-aldéhyde succinique qui est lui-même réintroduit dans le cycle de Krebs par le biais de l'acide succinique.

La liaison du GABA avec son récepteur entraîne, via la formation d'AMP cyclique, un changement de conformation des protéines transmembranaires du canal chlore qui est associé au récepteur, permettant un influx d'ions chlorures dans la terminaison post-synaptique. L'augmentation de la concentration cytoplasmique en anions provoque une hyperpolarisation, modifiant l'état électrique du neurone post-synaptique et le rendant moins facilement excitable. D'autre part, les interneurones GABAergiques, grâce à la diffusion du neuromédiateur hors de la synapse, modifient également l'état électrique des cellules nerveuses voisines et peuvent ainsi réguler des influx nerveux en dehors de la synapse GABAergique. Le GABA induit donc des variations de conductivité au chlore et exerce ainsi

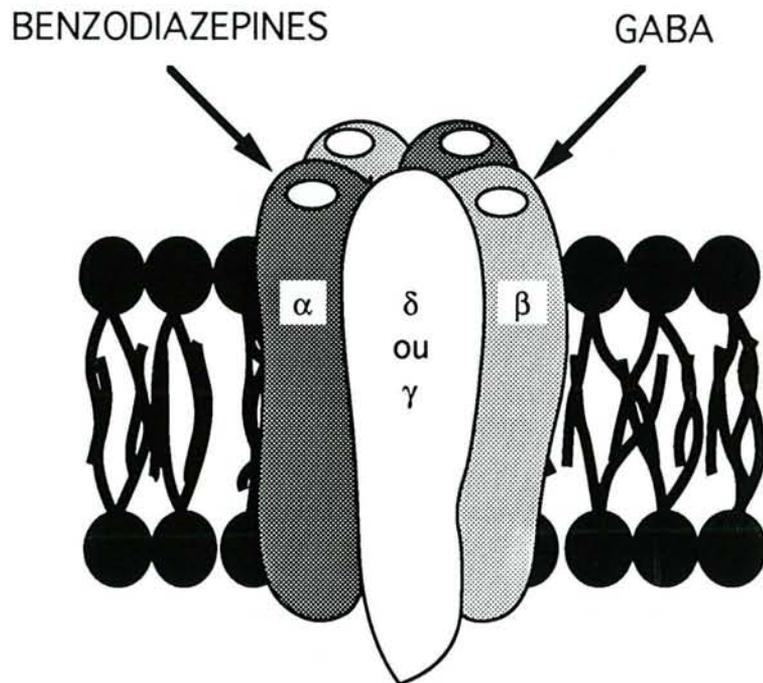


figure 4. Structure du complexe récepteur GABA_A/benzodiazépine (d'après Bacon et Viennot, 1991).

Le complexe macro-moléculaire est formé de cinq sous-unités polymériques enchassées dans la membrane plasmique : deux sous-unités α , deux sous-unités β et une sous-unité γ ou δ . Le site de liaison du GABA se trouve sur la sous-unité β et celui des benzodiazépines sur la sous-unité α . Le complexe contient au centre un canal transmembranaire perméable aux ions chlorures.

un effet inhibiteur en rendant les neurones moins sensibles aux stimuli des autres neuromédiateurs.

3.2.2. Le système des récepteurs GABA/benzodiazépines

Les récepteurs GABA appartiennent à la famille des récepteurs membranaires associés à un canal ionique. Il existe en fait 2 sous-types de récepteur GABA : les récepteurs GABA_A et GABA_B. Ces sous-classes de récepteurs lient toutes le GABA et conduisent toutes à l'inhibition neuronale.

a) le récepteur A du GABA

Le récepteur GABA_A est un récepteur ionotrope. Il comprend un site de liaison spécifique pour le GABA et des sites pour diverses substances psychotropes, en particulier pour les BZD, ces différents sites étant directement associés à un canal ionique.

Les récepteurs GABA_A sont principalement localisés au niveau post-synaptique et ont pour antagoniste la bicuculline.

Le récepteur GABA_A est un complexe macromoléculaire composé de plusieurs sous-unités protéiques organisées autour d'un canal chlore central. Ce complexe possède 4 sites de fixation, un pour le GABA, un pour les BZD, un pour des agents convulsivants comme la picrotoxine ou le PTZ et un pour les barbituriques (Bacon et Viennot, 1990) (*figure 2*).

Le clonage des ADN_c codant pour les différentes sous-unités de ce complexe a permis d'identifier 4 types de sous-unités α , β , γ et δ (*figure 4*). Quelle que soit la sous-classe considérée, le récepteur est formé de cinq sous-unités avec toujours 2 sous-unités α et 2 sous-unités β , la cinquième sous-unité étant soit une sous-unité γ , soit une sous-unité δ . Au niveau du complexe, le site récepteur du GABA est situé sur la sous-unité β et celui des BZD au niveau de la sous-unité α (Matsumoto, 1989) (*figure 4*). Mais il semble que seul le pentamère incluant la sous-unité γ^2 soit capable de fixer les BZD (Pritchett et coll., 1989).

Il apparaît donc que seule une fraction des complexes récepteurs GABA fixent aussi les BZD, expliquant ainsi les différences observées dans la localisation des sites de fixation GABA et BZD dans diverses études autoradiographiques (Bristow et Martin, 1988 ; Olsen et coll., 1986 ; Palacios et coll., 1981 ; Unnerstall et coll., 1981).

Il existe plusieurs sous-classes de récepteurs GABA_A définies en fonction de leur degré d'affinité pour le GABA (*figure 1*). On distingue ainsi :

- les sites de haute affinité
- les sites de basse affinité, qui sont impliqués dans le couplage avec le récepteur aux BZD
- les sites de très haute affinité

Les anxiolytiques comme les BZD exercent leurs actions pharmacologiques en intervenant au niveau des récepteurs GABA_A de basse affinité. La fixation des BZD sur leur site de liaison entraîne une modification de conformation du complexe [récepteur GABA_A/récepteur BZD/canal chlore] qui devient plus sensible au GABA. Elles renforcent donc l'action du GABA par une modulation dite allostérique du complexe, c'est-à-dire en agissant au niveau d'un point d'impact qui est différent du site de liaison au GABA et du canal chlore.

D'autre part, le GABA a également une influence sur les récepteurs aux BZD. En effet, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, les récepteurs aux BZD présentent une plus grande affinité pour ces molécules en présence de GABA ou d'agonistes GABAergiques. Il existe donc bien une réelle association fonctionnelle entre le système GABAergique et les BZD (Gallager et coll., 1980 ; Miller et coll., 1988).

b) le récepteur B du GABA

Le récepteur GABA_B appartient à la famille des récepteurs métabotropes. Il ne comporte que le site de liaison du GABA et est associé à distance à un canal cationique via un système de second messenger.

Les récepteurs GABA_B sont localisés à la fois au niveau pré et post-synaptique. Ils sont sensibles à l'action du baclofène et pas à celle de la bicuculline. D'une manière générale, les récepteurs GABA_B sont moins abondants que les récepteurs GABA_A. De plus, la distribution des deux types de récepteurs dans le SNC est différente. Ainsi, bien qu'ils soient présents simultanément dans de nombreuses régions du cerveau, il est des zones où n'existe qu'un seul type de récepteur GABA. C'est le cas du noyau interpedonculaire où seul le récepteur GABA_B a été mis en évidence (Bowery et coll., 1984).

Par ailleurs, il existerait un troisième classe de récepteur GABA, le récepteur GABA_C qui est stimulé par le GABA mais est insensible à l'action de la bicuculline comme du baclofène et dont le rôle physiologique reste à préciser (Drew et coll., 1984).

INTERET DE L'ETUDE

Des travaux récents de notre groupe ont montré qu'un traitement chronique précoce au phénobarbital (PhB) induit chez le rat des retards de croissance corporelle et cérébrale et de la maturation du métabolisme énergétique cérébral (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987 ; Pereira de Vasconcelos et coll., 1987 ; Schroeder et coll., 1991) ainsi que des troubles à long terme de l'activité fonctionnelle cérébrale et du comportement (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a, 1990b).

Le DZ est, avec le PhB, largement utilisé en clinique humaine et plus particulièrement en néonatalogie dans le traitement et la prévention des crises convulsives. Il nous a donc paru intéressant d'étudier, comparativement aux effets du PhB, les conséquences d'une exposition chronique précoce au DZ à dose anticonvulsivante sur le métabolisme énergétique cérébral et le comportement chez le rat immature et chez l'animal adulte.

D'autre part, les BZD font partie du groupe des substances dites d'abus et sont souvent utilisées en l'absence de tout contrôle médical (Cole et Chiarello, 1990 ; Miller et Gold, 1990). Cette utilisation abusive concerne l'ensemble de la population et parmi elle, des femmes enceintes ou qui allaitent leur enfant. Comme les BZD sont capables de traverser la barrière placentaire ou de passer dans le lait maternel, le foetus ou le nouveau-né peuvent être soumis à une exposition chronique aux BZD à des doses qui peuvent être relativement importantes avec des conséquences plus ou moins graves sur le développement neurocomportemental de l'enfant. Sur le plan de la maturation cérébrale, un rat nouveau-né peut être comparé à un foetus humain de 25 semaines, un rat de 10 jours à un nouveau-né à terme et un rat de 21 jours à un enfant âgé de 9 mois (Davidson et Dobbing, 1968 ; Romijn et coll., 1991). Ainsi, l'étude du métabolisme énergétique cérébral et du comportement chez le rat dans un modèle d'exposition chronique précoce au DZ comme celui qui a été développé dans ce travail devrait permettre de fournir des informations sur les conséquences à court et à long terme d'une exposition périnatale aux BZD sur le SNC chez l'homme

SECTION EXPERIMENTALE

1. TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE DES ANIMAUX ET CONDITIONS EXPERIMENTALES DE L'ETUDE

1.1. Traitement des animaux

L'étude a été effectuée sur des rats Sprague-Dawley. Les animaux, un mâle et deux femelles, ont été mis en accouplement pendant 5 jours et ont été maintenus en permanence dans des conditions standard avec un cycle jour/nuit de 12 h (la lumière est allumée à 6 h). La nourriture et l'eau sont disponibles à volonté. Les femelles sont isolées dans des cages séparées vers le 15^{ème} jour de gestation. Le lendemain de la naissance, les portées sont réduites à 12 animaux pour assurer des conditions homogènes d'expérimentation et comparables à celles utilisées dans des études réalisées au laboratoire sur les effets du PhB (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987 ; Pereira de Vasconcelos et coll., 1987 ; Schroeder et coll., 1991).

Les animaux traités ont reçu une injection sous-cutanée quotidienne de DZ (Valium[®], solution injectable, Roche) à la dose de 10 mg/kg du 2^{ème} au 21^{ème} jour de vie postnatale, le jour 0 étant celui de la naissance. Au cours de la même période, les animaux témoins ont reçu un volume équivalent du véhicule de la solution injectable de diazépam (propylène glycol, 40 %, éthanol, 10 %, alcool benzylique, 1,5 %, benzoate de sodium, 5 %).

Le traitement quotidien des animaux a lieu entre 8 h et 9 h et est identique pour tous les rats d'une même portée, ceci pour éviter le rejet de certains animaux par la mère du fait de la sédation et des perturbations comportementales qu'engendre le DZ par rapport au véhicule.

Sur ce modèle, ont été étudiés les effets à court et à long terme du traitement chronique précoce au diazépam sur divers aspects du métabolisme énergétique cérébral, tels que l'incorporation du carbone du glucose et du β -hydroxybutyrate dans les acides aminés cérébraux et l'utilisation cérébrale locale de glucose ainsi que sur les performances dans différents tests de comportement réalisés au cours du développement et chez l'adulte.

1.2. Conditions expérimentales

Les études de métabolisme ont été réalisées chez des animaux âgés de 5, 10, 14 et 21 jours 2 h 30 après la dernière injection de diazépam ou de véhicule, soit entre 10 h 30 et 11 h. Des mesures d'UCLG ont été également faites dans le même créneau horaire chez des rats âgés de 60 jours et uniquement de sexe mâle pour s'affranchir des variations de métabolisme liées au cycle menstruel chez la rate (Nehlig et coll., 1985). Afin de diminuer l'effet de portée, chacune des expérimentations a été réalisée au maximum sur 3 animaux provenant de la même portée.

Les études de comportement ont été faites aux stades de 4, 9, 14 et 20 jours pour les tests de développement neurocomportemental et à 60 jours pour les tests d'exploration, d'orientation et de mémorisation. Pour ces études de comportement, les animaux ont été maintenus en permanence dans des conditions standard avec un cycle jour/nuit de 12 h dont la périodicité a été modifiée (la lumière est allumée à 1 h). Les tests de développement ont été pratiqués chez tous les animaux d'une même portée juste avant le traitement, en l'absence de toute trace de DZ au niveau plasmatique et cérébral (*figure 5*). A l'âge adulte, les tests ont été faits uniquement sur des animaux mâles pour éviter de perturber le déroulement de ces tests du fait des passages successifs d'animaux mâles et femelles dans le même appareillage et pour s'affranchir des variations de comportement liées au cycle menstruel chez la rate. Les rats adultes ont été testés 1 h après le début de la période nocturne qui est le moment où les rats commencent à manifester une très grande activité.

2. EVOLUTION DES CONCENTRATIONS PLASMATIQUES ET CEREBRALES DE DIAZEPAM

Dans le but de caractériser ce modèle d'exposition chronique précoce au DZ sur le plan pharmacocinétique, les taux plasmatiques et cérébraux de DZ et de son métabolite, le N-desméthyl diazépam (DMDZ) ont été mesurés à différents temps dans les 24 heures suivant l'administration de DZ chez des animaux âgés de 5, 10, 14 et 21 jours par chromatographie liquide haute performance (CLHP) selon un protocole adapté d'après les techniques décrites par Kabra et coll. (1978), Vree et coll. (1979) et Yoong et coll. (1986).

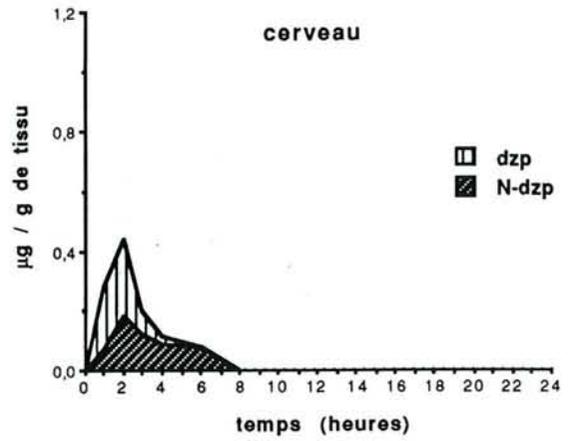
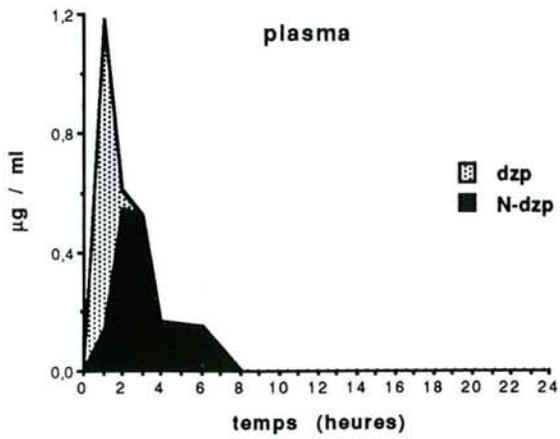
Une à deux heures après la dernière injection de DZ, les taux plasmatiques et cérébraux de DZ atteignent un pic qui est compris entre 0,19-1,19 $\mu\text{g/ml}$ et 0,20-0,58 $\mu\text{g/g}$ de tissu selon l'âge étudié alors que les concentrations de DMDZ sont au maximum de 0,55 $\mu\text{g/ml}$ pour le plasma et 0,18 $\mu\text{g/g}$ de tissu pour le cerveau à 5 jours de vie postnatale (*figure 5*).

Puis ces concentrations diminuent avec le temps et plus aucune trace de DZ et de DMDZ n'est détectable dans le plasma ou le cerveau au delà de 8 heures après l'administration de DZ (*figure 5*).

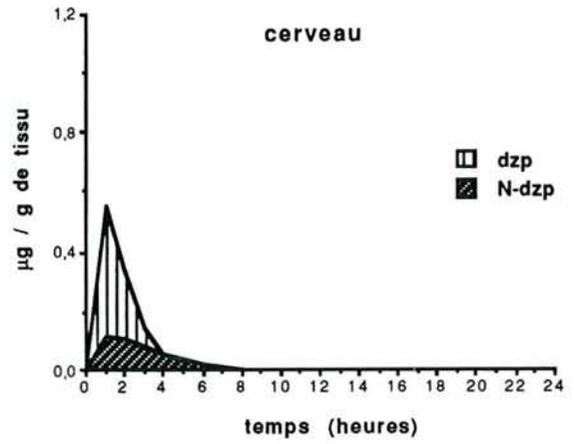
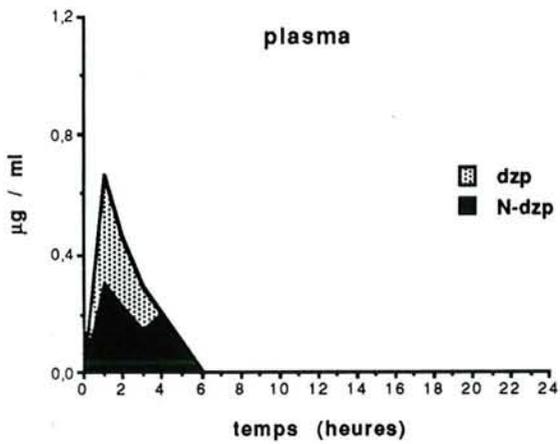
Deux et trois heures après l'injection du DZ, les concentrations plasmatiques varient respectivement entre 0,31-0,61 $\mu\text{g/ml}$ et 0,14-0,39 $\mu\text{g/ml}$ en fonction de l'âge (*figure 5*) et sont comparables à celles mesurées chez l'homme lorsque le DZ est administré à dose anticonvulsivante. En effet, des concentrations circulantes de DZ comprises entre 0,30 et 0,70 $\mu\text{g/ml}$ permettent chez l'homme de stopper les manifestations cliniques d'une crise convulsive et des taux plasmatiques de l'ordre de 0,20 $\mu\text{g/ml}$ sont ensuite suffisants pour empêcher la réapparition des crises (Baldy-Moulinier, 1984 ; Farrell, 1986, Schmidt, 1983). Ces concentrations sont atteintes chez l'enfant en 4 à 5 minutes après administration de DZ à la dose de 1 mg/kg par voie rectale ou intramusculaire (Meberg et coll., 1978) ou à la dose de 0,2 mg/kg par voie intraveineuse (Schmidt, 1983).

Au niveau cérébral, les taux tissulaires de DZ mesurés entre 5 et 21 jours d'âge postnatal sont compris entre 0,22 et 0,45 $\mu\text{g/g}$ 2 heures après l'injection de DZ et entre 0 et 0,20 $\mu\text{g/g}$ 3 heures après (*figure 5*). Ces résultats sont comparables aux concentrations cérébrales observées par Garattini et coll. (1973) chez le rat nouveau-né lorsque le DZ est administré à la dose efficace 50 (DE_{50}) dans un modèle de convulsions induites par le PTZ 60 minutes après l'injection de DZ. Dans ces conditions, la DE_{50} du DZ est de 0,058 mg/kg et le taux cérébral de DZ de 0,207 $\mu\text{g/g}$ de tissu.

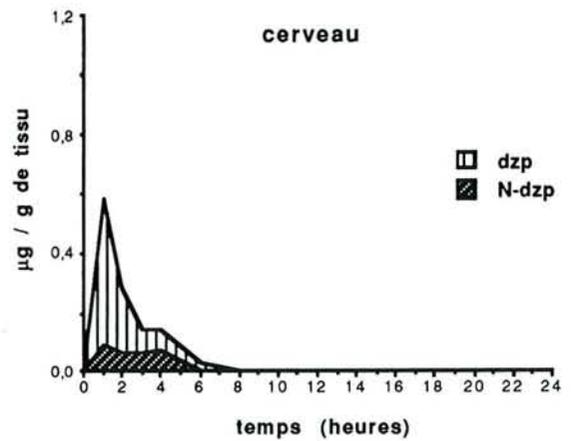
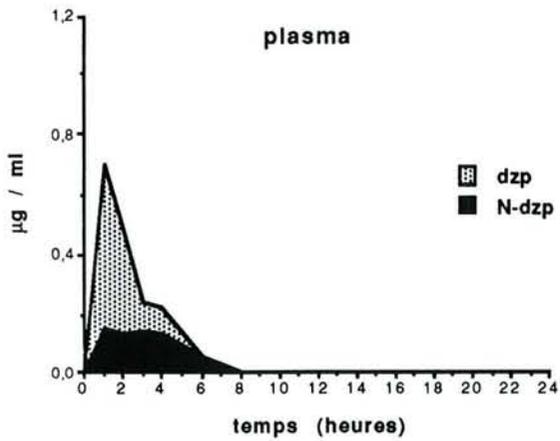
5 jours



10 jours



14 jours



21 jours

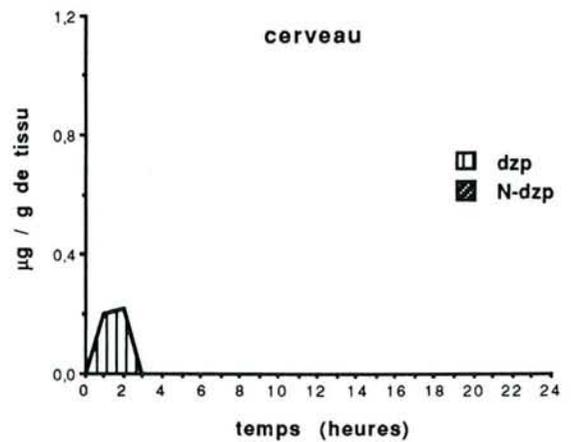
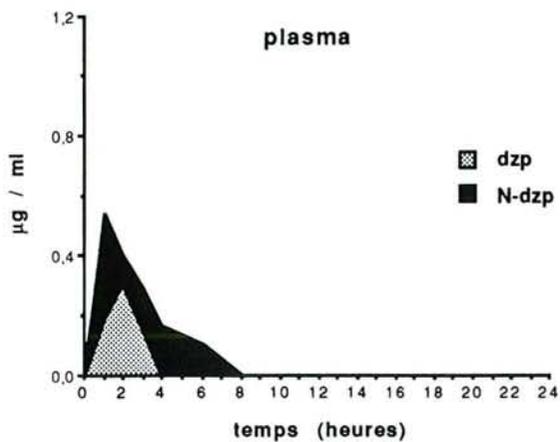


figure 5 : Evolution au cours des 24 heures qui suivent l'administration de diazépam, des concentrations plasmatiques et cérébrales de diazépam (dzp) et de son métabolite, le N-desméthyldiazépam (N-dzp) chez des rats âgés de 5 à 21 jours.

Les concentrations plasmatiques sont exprimées en $\mu\text{g/ml}$ et les taux cérébraux en $\mu\text{g/g}$ de tissu.

Les valeurs représentent des moyennes de 3 à 5 prélèvements pour chaque temps.

L'évolution des concentrations plasmatiques et cérébrales de DMDZ est similaire à celle du DZ mais à des taux plus faibles aux âges de 5, 10 et 14 jours. Par contre, à 21 jours, le DMDZ est présent à des concentrations plus élevées que le DZ dans le plasma et est totalement absent dans le cerveau (*figure 5*). Ces particularités sont dues à la maturation des capacités métaboliques du rat et plus particulièrement de la voie de desméthylation au cours de cette période, reflétée par l'augmentation de différentes activités enzymatiques dans des microsomes de foie de rat entre 10 et 30 jours de vie postnatale (Basu et coll., 1971).

Le DMDZ a également un pouvoir protecteur contre les crises convulsives induites chez l'animal par le PTZ et contribue ainsi à la persistance des effets anticonvulsivants du DZ (Frey et Löscher, 1982 ; Garattini et coll., 1973). Or, les taux cérébraux de DMDZ mesurés dans notre modèle 2 à 3 heures après l'administration du DZ sont compris entre 0,1 et 0,2 µg/g de tissu entre 5 et 14 jours d'âge postnatal et sont de l'ordre de ceux observés lors du traitement de rats adultes avec du DZ à la DE₅₀ dans un modèle de convulsions provoquées par le PTZ (Garattini et coll., 1973).

Par ailleurs, ces concentrations mesurées 2 à 3 heures après l'injection du DZ correspondent parfaitement sur le plan comportemental, à la fin de la sédation induite par cette drogue et à une reprise d'activité des animaux dans la cage, notamment aux stades les plus immatures.

En conclusion, ces résultats ont motivé la décision de procéder aux différentes expérimentations entre 2 et 3 heures après la dernière administration de DZ, moment où l'on n'observe plus d'effets sédatifs du traitement et où les taux circulants et cérébraux de DZ et de DMDZ sont comparables à ceux observés chez l'homme et chez l'animal lorsque ces molécules sont utilisées à dose anticonvulsivante.

3. EFFETS GENERAUX D'UN TRAITEMENT CHRONIQUE PRECOCE AU DIAZEPAM

Aucune mortalité n'a été observée au cours de cette étude que ce soit chez les animaux traités avec le véhicule ou avec le DZ. Ce résultat montre que la dose de 10 mg/kg de DZ administrée au rat pour ce travail est largement inférieure à la dose létale 50 (DL₅₀) du DZ chez l'animal immature. A titre de comparaison, la DL₅₀ du DZ est de 278 mg/kg chez la souris (Marcucci et coll., 1968) et de 1800 mg/kg chez le rat adulte (Randall et coll., 1965).

Cette dose permet d'obtenir chez le rat immature des concentrations circulantes de DZ qui sont similaires à celles mesurées chez l'homme lorsque cette molécule est utilisée en tant qu'anticonvulsivant (cf. chapitre 2). Cependant, l'utilisation du DZ à dose anticonvulsivante n'est pas sans effet sur la maturation corporelle et cérébrale tant chez l'enfant que chez l'animal.

Le DZ est doué à la fois de propriétés sédatives et anticonvulsivantes. C'est ainsi que dans notre étude, le DZ induit, en début de traitement, une sédation transitoire de 2 à 3 heures. Les effets sédatifs diminuent progressivement pour disparaître complètement vers la fin de la 2ème semaine de vie postnatale. L'absence de sédation à partir de 14 jours d'âge postnatal est sans conteste liée à la diminution des taux plasmatiques et cérébraux de DZ et de DMDZ entre 14 et 21 jours (Garattini et coll., 1973) et au développement possible d'une tolérance au DZ (Frey et coll., 1984).

Il est à noter, qu'au cours de cette période de sédation, le comportement de la mère vis-à-vis de ses petits ne semble pas être perturbé. Aucune réaction de rejet des animaux par la mère n'a pu être observée après l'administration du DZ. Celle-ci continue de regrouper les jeunes au sein du nid et de les protéger notamment contre les variations de la température ambiante. C'est ainsi qu'aucune variation de la température corporelle n'a été observée au cours des 3 à 4 heures qui suivent l'injection de DZ, quel que soit l'âge des animaux.

D'autre part, les rats traités au DZ sont incapables de téter au cours de cette période de sédation à la différence des témoins. Par contre, une fois les effets sédatifs du DZ disparus, la fréquence des tétées est identique dans les 2 groupes d'animaux.

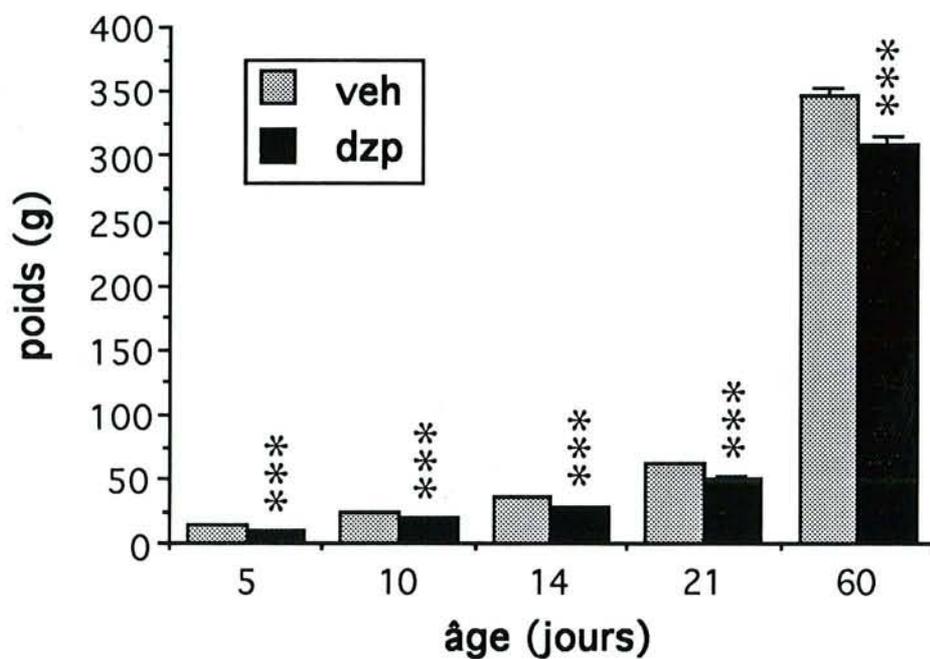


figure 6 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur l'évolution postnatale du poids corporel chez le rat.

Les valeurs représentent des moyennes \pm e.s.m. de 10 à 21 animaux
 *** $p < 0,001$, différence statistiquement significative par rapport au véhicule (*t*-test de Student)

3.1. Effets sur la croissance corporelle

L'administration quotidienne de DZ entre le 2^{ème} et le 21^{ème} jour de vie postnatale induit une diminution significative de l'ordre de 18 % du poids des animaux traités au DZ par rapport aux témoins tout au long de la période du développement étudiée (*figure 6*). De plus, ce déficit de croissance corporelle induit par le DZ persiste à l'âge adulte. En effet, à 60 jours, le poids des rats traités au DZ est diminué de manière significative de 11 % par rapport à celui observé chez les témoins (*figure 6*).

De la même façon, de nombreuses études ont mis en évidence un retard de croissance corporelle chez les animaux traités avec différentes BZD pendant les premières semaines de la vie postnatale telles que le clonazépam (File, 1986b ; Wang et Huang, 1990), le lorazépam ou le DZ (File, 1986a, 1986c).

D'autre part, il semble que les effets des BZD sur la croissance corporelle varie selon la période d'exposition et la molécule utilisée.

Ainsi, contrairement à un traitement postnatal, une exposition au DZ du 4^{ème} au 20^{ème} jour de gestation à la dose de 10 mg/kg/jour chez le rat n'induit aucune modification significative du poids des animaux nouveau-nés jusqu'à 30 jours de vie postnatale (Frieder et coll., 1984a ; Gai et Grimm, 1982). Par contre, l'administration chronique de CDP chez la souris gestante induit dans la descendance un retard de croissance corporelle qui est significatif à partir du 8^{ème} jour après la naissance (Pankaj et Brain, 1991).

Par ailleurs, cette réduction du poids corporel chez des animaux traités avec différentes BZD en période périnatale est dose-dépendante (Collignon, 1988 ; File, 1986a, 1986b, 1986c ; Pankaj et Brain, 1991 ; Wang et Huang, 1990).

Ainsi, l'administration chronique de clonazépam à la dose de 0,5 mg/kg/jour du 1^{er} au 21^{ème} jour de vie postnatale induit, chez le rat comme chez la souris, une diminution de l'ordre de 25 % du poids des animaux âgés de 21 jours alors que le même traitement à la dose de 0,1 mg/kg/jour ne provoque aucune modification de la croissance corporelle des animaux (File, 1986b ; Wang et Huang, 1990).

De la même manière, l'administration chronique de DZ au cours des 3 premières semaines de vie postnatale chez le rat entraîne, aux doses de 5, 10 et 20 mg/kg/jour, des réductions du poids corporel de, respectivement, 14, 27 et 38 % chez les animaux âgés de 10 jours (Collignon, 1988). A 21 jours, les rats qui ont reçu du DZ à la dose de 5 mg/kg/jour ne présentent plus de diminution significative du poids corporel par rapport aux témoins alors qu'aux doses de 10 et 20 mg/kg/jour, le DZ induit à ce stade un abaissement significatif de 11 et 27 % du poids des animaux (Collignon, 1988).

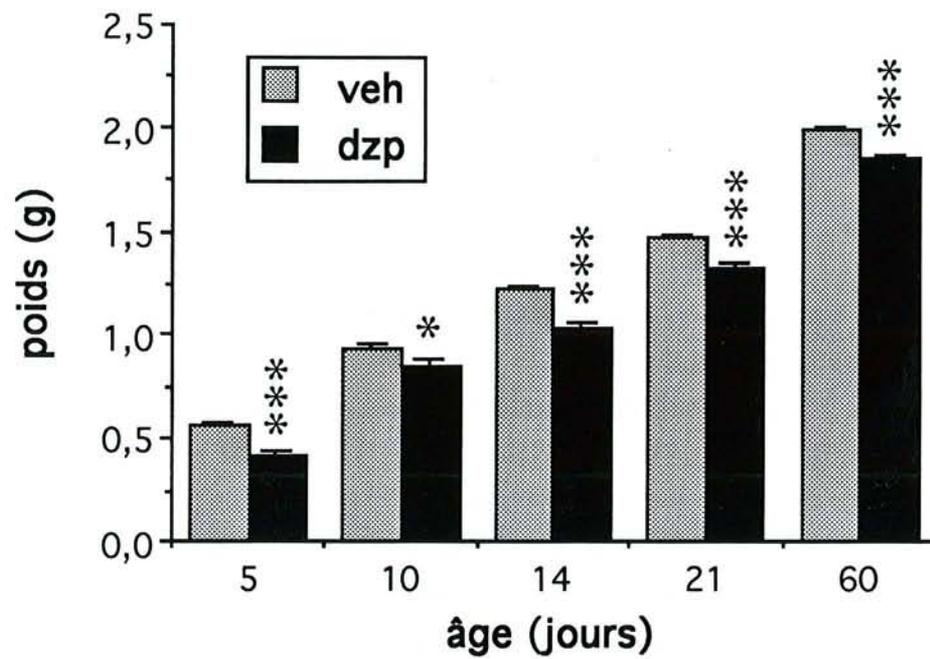


figure 7 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur l'évolution postnatale du poids du cerveau chez le rat.

Les valeurs représentent des moyennes \pm e.s.m. de 7 à 10 animaux
 * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, différences statistiquement significatives par rapport au véhicule (*t*-test de Student)

3.2. Effets sur la croissance cérébrale

En plus du retard de croissance corporelle, l'administration chronique précoce de DZ induit également des déficits de la croissance cérébrale qui apparaissent dès le 5^{ème} jour de vie postnatale et persistent jusqu'à l'âge adulte (*figure 7*). La réduction du poids du cerveau observée chez les animaux traités au DZ est significative à tous les stades étudiés et varie de 7 à 26 % (*figure 7*).

Wang et Huang (1990) ont également mis en évidence une diminution significative de 16 % du poids du cerveau chez des souris âgées de 22 jours qui ont été traitées avec du clonazépam (0,5 mg/kg/jour) pendant 21 jours. De plus, ces auteurs montrent que la réduction du poids du cerveau s'accompagne d'une baisse significative du poids du cortex, du cervelet et du tronc cérébral au même stade.

D'autre part, l'administration chronique précoce de BZD induit un retard de croissance cérébrale qui est aussi dose-dépendant (Collignon, 1988 ; Wang et Huang, 1990).

Ainsi, des baisses significatives d'environ 10 et 16 % du poids du cerveau ont été mises en évidence entre 10 et 21 jours de vie postnatale chez des rats traités avec du DZ aux doses respectives de 10 et 20 mg/kg/jour. Par contre, l'administration de 5 mg/kg/jour de DZ n'affecte pas la croissance cérébrale au cours de la même période (Collignon, 1988).

Cette réduction du poids cérébral est certainement le reflet de modifications de la morphologie et du volume des cellules nerveuses et non d'une réduction du nombre des neurones (Daval et coll., 1988 ; Frieder et coll., 1984b).

3.3. Effets sur la pousse des poils et l'ouverture des yeux

En plus de l'évolution pondérale, le moment de l'ouverture des yeux et de la pousse des poils représentent des indices facilement observables de la maturation physique des jeunes rats. La pousse des poils apparaît vers le 9^{ème} jour de vie postnatale et l'ouverture des yeux vers le 14^{ème} jour (Altman et Sudarshan, 1975). L'ouverture physique des yeux s'accompagne au 15^{ème} jour de l'apparition d'une activité électroencéphalographique comparable à celle observée chez l'animal adulte (Math et coll., 1974) et d'une augmentation importante de l'activité fonctionnelle cérébrale dans les structures du système visuel (Nehlig et coll., 1988).

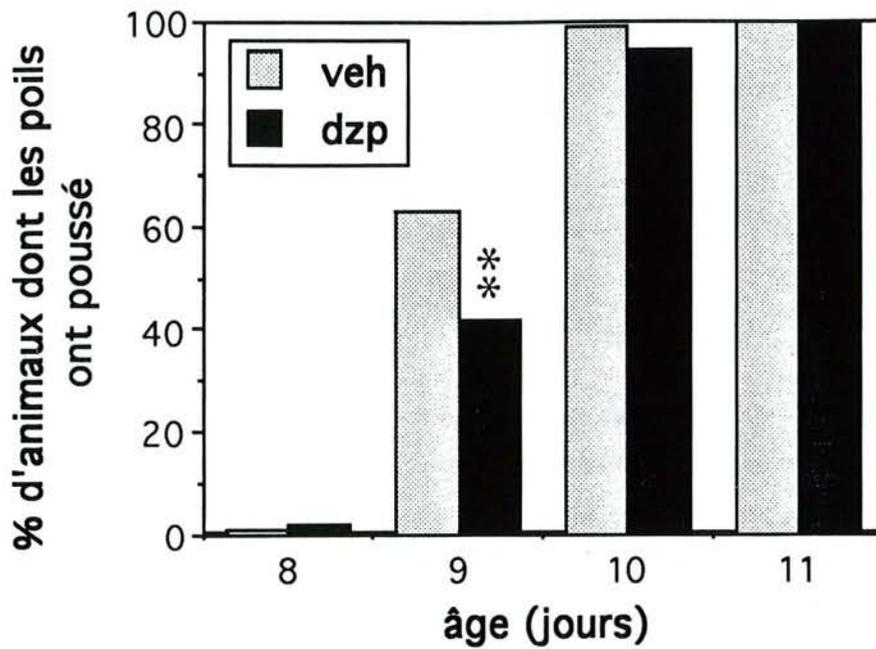


figure 8 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur la pousse des poils chez le rat

Les valeurs représentent le pourcentage d'animaux dont le pelage est apparu entre 8 et 11 jours de vie postnatale.

** $p < 0,01$, différence statistiquement significative (test de χ^2).

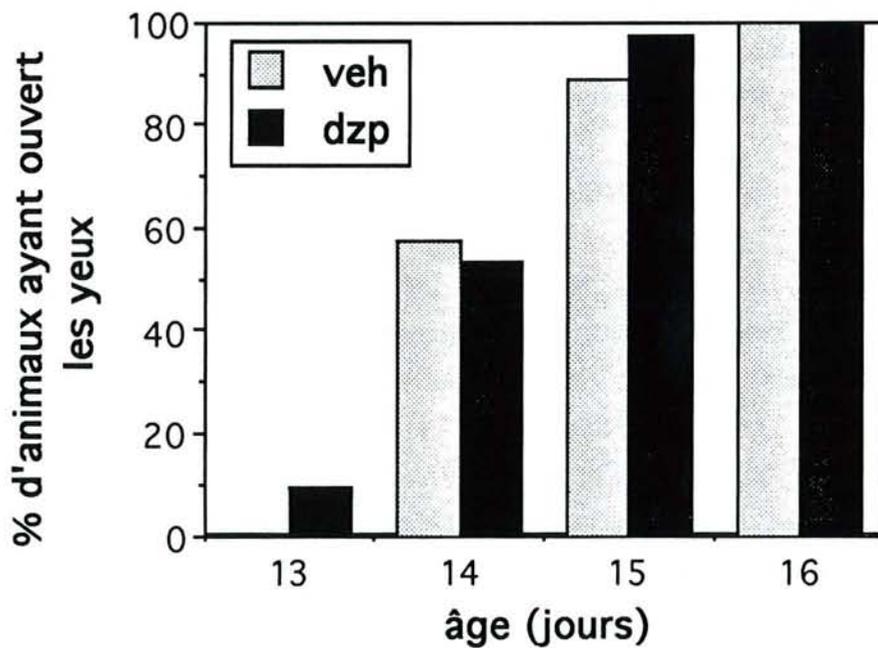


figure 9 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur l'ouverture des yeux chez le rat

Les valeurs représentent le pourcentage d'animaux dont les yeux se sont ouverts entre 13 et 16 jours de vie postnatale.

L'administration chronique de DZ induit un retard dans l'apparition des poils par rapport aux témoins mais ne modifie pas le moment de l'ouverture des yeux. Ainsi, au 9ème jour de vie postnatale, le nombre d'animaux dont les poils ont poussé est significativement plus faible dans le groupe des rats traités au DZ (42 %) que dans celui des témoins (63 %) (*figure 8*). Cette différence entre les 2 groupes existait encore à 10 jours mais elle n'est plus significative ($p=0,068$, test de χ^2).

Par contre, aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence dans le nombre d'animaux ayant ouvert leurs yeux dans les 2 groupes entre 13 et 16 jours après la naissance (*figure 9*).

D'autre part, il existe une corrélation négative entre le poids des animaux et le moment de la pousse des poils chez les rats traités avec le véhicule ($r = 0,35$, $p < 0,01$) ou le DZ ($r = 0,53$, $p < 0,01$) ainsi qu'entre le poids et l'ouverture des yeux dans le groupe témoin ($r = 0,45$, $p < 0,05$). Par contre, il n'existe plus de corrélation significative entre ces 2 paramètres chez les animaux traités au DZ, soulignant ainsi la grande variabilité de la sensibilité des animaux vis-à-vis du DZ.

4. DIAZEPAM ET MATURATION DU METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL

4.1. Evolution du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement postnatal

4.1.1. Consommation cérébrale d'oxygène

Chez l'homme adulte, le cerveau est certainement celui qui consomme le taux le plus élevé d'O₂ parmi les différents organes. C'est ainsi qu'il utilise 20 % de l'O₂ fourni à l'organisme alors qu'il ne représente que 2 % du poids corporel total. La maturation du métabolisme énergétique cérébral est caractérisée par des changements quantitatifs et qualitatifs accompagnés d'une augmentation importante de la consommation d'O₂.

La consommation cérébrale d'O₂ évolue donc selon une courbe en S au cours du développement postnatal. Le taux de consommation d'O₂ est faible à la naissance puis augmente rapidement pendant la période de croissance active du cerveau pour atteindre les valeurs observées chez l'adulte qui sont plus du double de celles mesurées à la naissance (Fazekas et coll., 1951).

4.1.2. Utilisation du glucose comme substrat normal du métabolisme énergétique cérébral

Tant chez l'homme que chez l'animal adulte, le glucose est le substrat presque exclusif du métabolisme cérébral (Kety, 1957 ; Sokoloff et coll., 1977a). Cette affirmation repose d'une part sur la mise en évidence des dégradations de la fonction et du métabolisme énergétique quand le cerveau est privé de glucose et d'autre part, sur l'incapacité d'autres substrats potentiels à prévenir ou à renverser les effets de l'hypoglycémie.

Le glucose est prélevé en excès par le cerveau, la majeure partie étant utilisée pour la production d'énergie mais également comme substrat pour la synthèse de différents composants biochimiques comme les acides aminés cérébraux. Une faible part du glucose est rejetée dans le sang sous forme de lactate ou d'autres intermédiaires du métabolisme des glucides (Sokoloff et coll., 1977a).

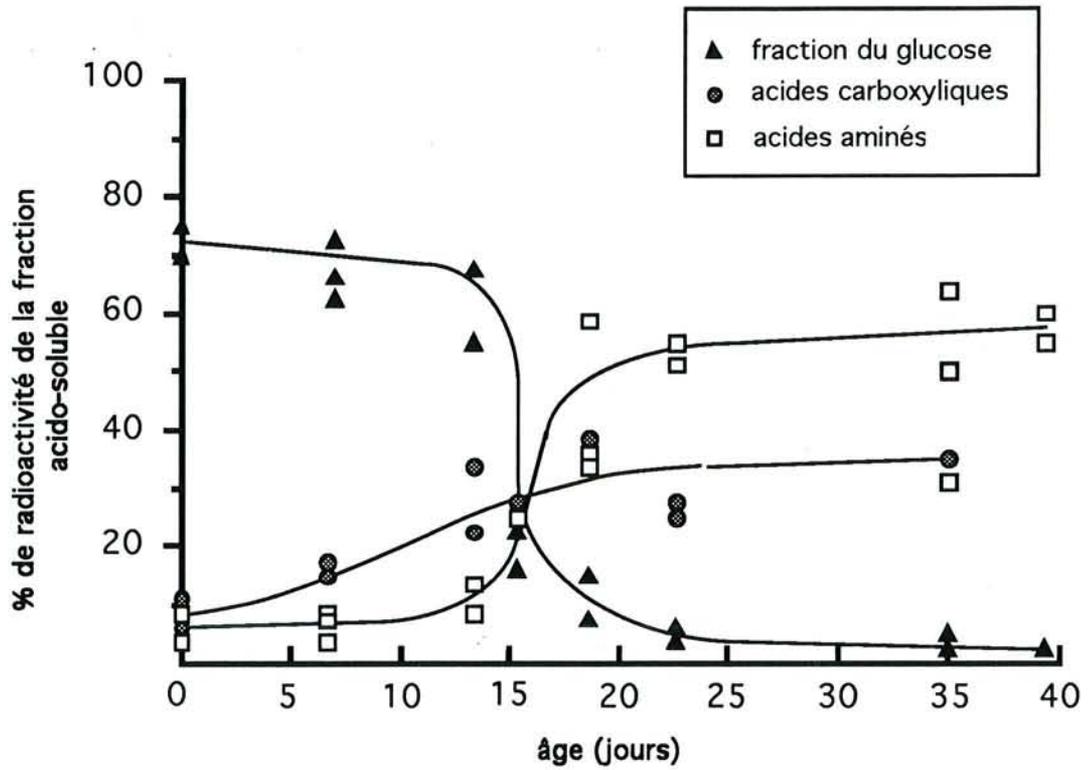


figure 10 : distribution de la radioactivité dans les fractions glucose, acides aminés et acides carboxyliques du cerveau de rat au cours du développement postnatal, 20 minutes après l'injection de glucose-(U- ^{14}C)

L'ordonnée représente le ^{14}C présent dans les différentes fractions exprimé en pourcentage du ^{14}C total dans l'extrait acido-soluble du cerveau de rat (d'après Gaitonde et Richter, 1966).

a) utilisation du glucose en tant que précurseur de la synthèse des acides aminés cérébraux

L'incorporation rapide et importante du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux via la glycolyse et le cycle de Krebs est une caractéristique fondamentale du métabolisme énergétique du cerveau mature in vivo (Busch et coll., 1960 ; Gaitonde et coll., 1965 ; Vrba et coll., 1962). Trente minutes après l'injection de glucose-^(14C) à des rats adultes, 98 % de la radioactivité est incorporée dans la fraction acido-soluble cérébrale, les acides aminés représentant 94 % de cette radioactivité (Gaitonde et coll., 1965).

Au cours du développement postnatal, le processus d'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux n'apparaît, chez le rat, qu'entre le 10ème et le 15ème jour de vie postnatale pendant la phase active de croissance cérébrale (Gaitonde et Richter, 1966). En effet, 20 minutes après l'injection de glucose-^(14C), le taux d'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux reste faible de la naissance au 12ème jour de vie (2-13 %) puis augmente rapidement pour atteindre à 21 jours des valeurs qui sont proches de celles observées chez l'adulte (45-60 %) (Cocks et coll., 1970 ; Gaitonde et Richter, 1966 ; Patel et coll., 1974 ; *figure 10*).

b) taux régionaux d'utilisation de glucose

La mesure des taux d'UCLG par la technique d'autoradiographie quantitative au 2DG-^(14C) adaptée à l'animal en développement par Nehlig et coll. (1988) a permis de confirmer les résultats obtenus précédemment in vitro ou in vivo (Himwich, 1951 ; Gaitonde et Richter, 1966 ; Gregoire et coll., 1978).

De la même façon que la consommation cérébrale d'O₂ ou l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux, l'UCLG évolue selon une courbe en S au cours du développement postnatal. Ainsi, les taux d'utilisation de glucose restent faibles entre 10 et 17 jours (de l'ordre de 20 à 40 µmol/100g/mn) puis augmentent de 50 à 100 % entre 17 et 21 jours d'âge postnatal dans la plupart des aires étudiées. L'UCLG augmente encore de 25 % dans de nombreuses structures entre 21 et 35 jours pour atteindre à ce stade des valeurs comparables à celles mesurées chez l'adulte.

c) enzymes du métabolisme du glucose

L'accroissement des besoins énergétiques associé au développement de l'activité fonctionnelle cérébrale s'accompagne d'une augmentation de l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le métabolisme aérobie du glucose (Nehlig et Pereira de Vasconcelos, 1993, pour revue).

C'est ainsi que de nombreuses études ont montré que l'activité des enzymes de la glycolyse comme l'hexokinase, la phosphofructokinase, l'aldolase ou la lactate deshydrogénase est multipliée par 3 entre le 8ème et le 20ème jour de vie postnatale alors que celle des enzymes du métabolisme oxydatif du glucose comme la cytochrome oxydase augmente plus tardivement, à partir du 20ème jour pour atteindre vers 40 jours après la naissance les valeurs observées chez l'adulte (Bilger et Nehlig, 1991).

En parallèle, l'activité de la glucose-6-phosphate deshydrogénase, enzyme clé du shunt des pentoses phosphates, atteint un pic à 21 jours puis diminue pour arriver chez l'adulte à des valeurs très faibles, de l'ordre de celles observées à la naissance (Bilger et Nehlig, 1992). Cette évolution souligne le rôle particuliers et essentiel de cette voie métabolique au cours du développement postnatal. En effet, près de 10 % du glucose est métabolisé par cette voie à la naissance et seulement 1 à 2% chez l'adulte (Hakim et coll., 1980 ; Hothersall et coll., 1979). Cette voie métabolique fournit des pentoses et du NADPH, facteurs indispensables à la biosynthèse des acides nucléiques et des lipides qui est particulièrement active au cours des premières semaines de la vie postnatale (Benjamins et McKahnn, 1981).

4.1.3. Utilisation des composés cétoniques par le cerveau

Le cerveau, comme d'autres tissus, est capable d'adapter son métabolisme et d'utiliser d'autres substrats que le glucose, notamment quand l'apport en glucose est limité (McIlwain, 1971). Ainsi, en cas de cétose, les composés cétoniques comme le β -hydroxybutyrate (β HB) et acétoacétate (ACA) qui sont des sous-produits de la dégradation hépatique des acides gras peuvent être utilisés par le cerveau en tant que précurseurs pour son métabolisme (Hawkins et coll., 1971 ; Owen et coll., 1967).

a) concentrations circulantes et différences artério-veineuses

Au cours du développement postnatal, et plus particulièrement pendant la période d'allaitement, les jeunes rats sont placés dans un état de cétose d'origine nutritionnelle du fait de la très grande richesse du lait maternel en lipides (de l'ordre de 50 %) (Dymsza et coll., 1964). Ainsi, les concentration sanguines de β HB et d'ACA qui sont très faibles à la naissance et comparables à celles mesurées chez l'adulte dans des conditions normales (Krebs et coll., 1971) augmentent avec le début de l'allaitement et restent élevées jusqu'au sevrage (vers le 21e jour de vie postnatale). Passé ce stade, ces concentrations diminuent pour atteindre très rapidement les taux qui sont observés chez l'adulte.

Pendant toute cette période, les composés cétoniques sont prélevés par le cerveau et représentent des substrats au moins aussi importants que le glucose pour le métabolisme énergétique cérébral (Cremer et Heath, 1974) et la biosynthèse des lipides cérébraux (Edmond, 1974). La mesure des différences artério-veineuses cérébrales de β HB et d'ACA

montrent ainsi que le prélèvement de ces substrats est 3 à 4 fois plus élevé chez le jeune animal ou le nouveau-né humain que chez l'adulte pour une concentration artérielle donnée (Dahlquist et Persson, 1976 ; Hawkins et coll., 1971 ; Kraus et coll., 1974 ; Krebs et coll., 1971 ; Schroeder et coll., 1991)

b) utilisation des composés cétoniques en tant que précurseur de la synthèse des acides aminés et des lipides cérébraux

Les concentrations cérébrales de glutamate chez le jeune rat représentent 50 % de celles observées chez l'adulte alors que la conversion du glucose dans ces acides aminés est quasiment inexistante (Gaitonde et Richter, 1966 ; Patel et coll., 1974), suggérant que cet acide aminé dérive, du moins en partie, d'un autre précurseur que le glucose. Partant de cette hypothèse, De Vivo et coll. (1973, 1975) ont montré, en étudiant l'incorporation de β HB-(3- 14 C) et de glucose-(2- 14 C) dans les acides aminés chez le rat de la naissance à 21 jours, que le β HB est un précurseur 2 à 3 fois plus actif que le glucose pour la synthèse des acides aminés jusqu'au 15^e jour de vie postnatale.

D'autre part, les composés cétoniques sont des précurseurs essentiels de la biosynthèse des lipides cérébraux tant chez l'adulte que chez l'animal immature (Yeh et coll., 1977 ; Yeh et Sheenan, 1985).

Au cours du développement postnatal, le β HB et l'ACA sont les substrats préférentiels de la synthèse des lipides cérébraux par rapport au glucose. Le taux de synthèse des lipides à partir de β HB ou d'ACA marqués au 14 C atteint un pic entre le 5^{ème} et le 15^{ème} jour après la naissance selon les auteurs (Lopez-Cardozo et Klein, 1984 ; Patel et Owen, 1977 ; Swiatek et coll., 1984 ; Yeh et coll., 1977 ; Yeh et Sheenan, 1985) puis diminue régulièrement au cours de la période d'allaitement (Yeh et coll., 1977 ; Yeh et Sheenan, 1985).

c) enzymes du métabolisme des composés cétoniques

Au cours du développement postnatal, les enzymes spécifiques du métabolisme oxydatif des composés cétoniques, la β -hydroxybutyrate deshydrogénase, la 3-cétoacide-CoA transférase et l'acétoacétyl-CoA thiolase présentent une évolution qui est unique. Ainsi, parallèlement à l'accroissement des taux sanguins de β HB et d'ACA, l'activité de ces enzymes augmente jusqu'à 20-25 jours après la naissance puis diminue après le sevrage pour atteindre les valeurs observées chez l'adulte (Bilger et Nehlig, 1992 ; Klee et Sokoloff, 1967 ; Krebs et coll., 1971 ; Dahlquist et coll., 1972 ; Middleton, 1973).

Il est à noter que l'évolution de l'activité de l'acétoacétyl-CoA thiolase au cours du développement postnatal est différente si l'on considère l'enzyme présente dans le cytosol ou celle située au niveau des mitochondries (Middleton, 1973).

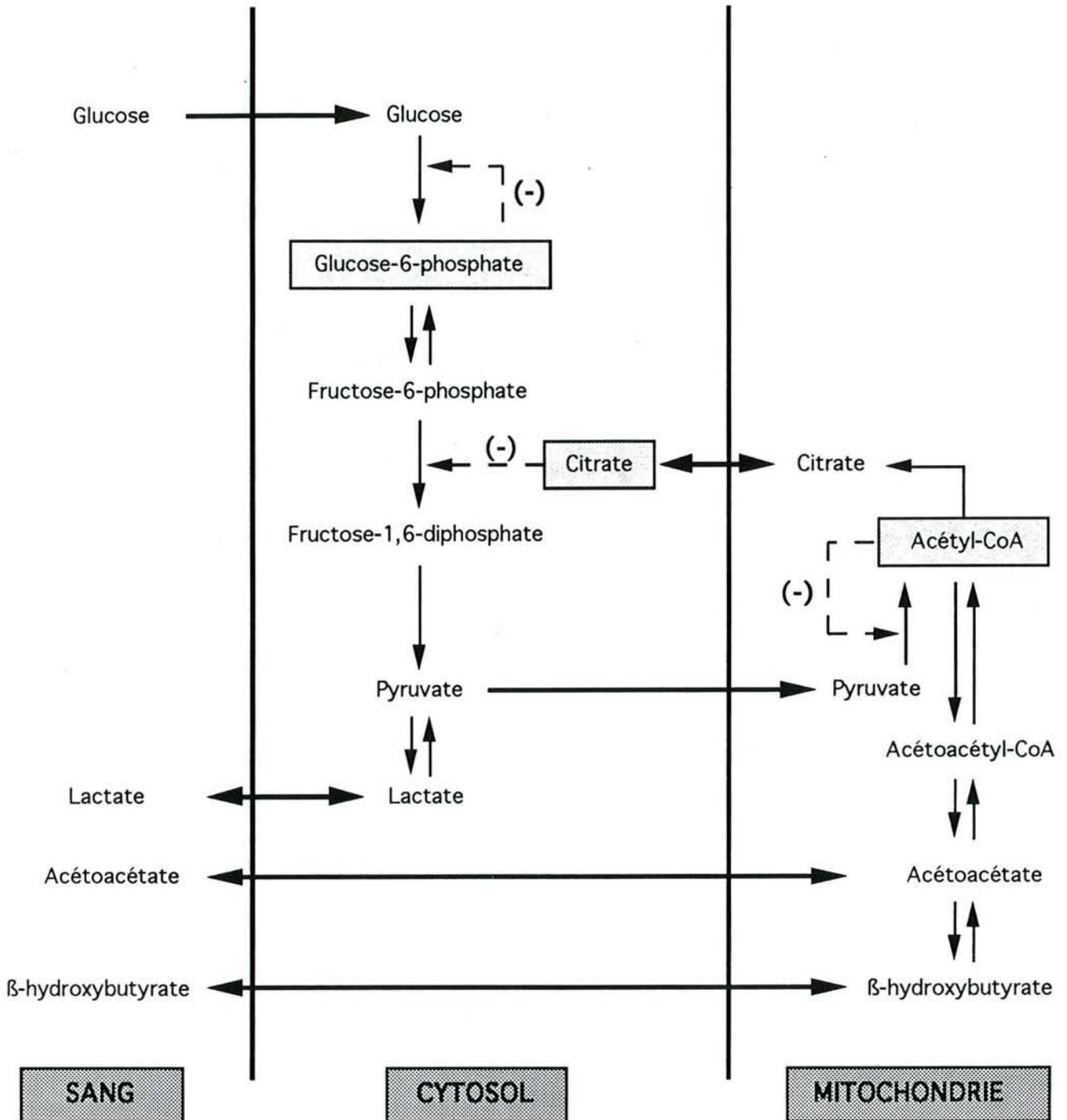


figure 11 : Interactions entre le métabolisme des glucides et des composés cétoniques dans les tissus périphériques. Le signe (-) indique un site d'inhibition par un métabolite (d'après Robinson et Williamson, 1980).

L'activité de l'enzyme mitochondriale évolue de la même manière que les autres enzymes du métabolisme oxydatif des composés cétoniques. Par contre, l'activité de l'acétoacétyl-CoA thiolase cytosolique est maximale à la naissance puis diminue progressivement tout au long de la période de maturation cérébrale pour atteindre les valeurs observées chez l'adulte.

4.1.4. Régulation de l'utilisation du glucose par les composés cétoniques

Les composés cétoniques peuvent réduire le métabolisme oxydatif du glucose (Drury et Wick, 1952 ; Balasse, 1971). De plus, différentes études (Ide et coll., 1969 ; Ruderman et coll., 1974 ; Patel et Owen, 1977) ont montré, *in vitro*, que le β HB et l'ACA provoquent une diminution de l'utilisation de glucose et inhibent l'oxydation du pyruvate au niveau cérébral. La régulation de l'utilisation de glucose par les composés cétoniques dans les tissus périphériques a pour conséquence une économie de glucose, le lactate et le pyruvate pouvant être reconvertis en glucose par la voie de la gluconéogénèse.

Le principal site de régulation du métabolisme des glucides par les composés cétoniques se trouve au niveau de 2 enzymes clé de la glycolyse, la phosphofructokinase et l'hexokinase (*figure 11*) (Randle et coll., 1964, 1970). Ainsi, le citrate provenant du métabolisme de l'ACA au niveau mitochondrial peut passer dans le cytosol où il inhibe la phosphofructokinase. En conséquence, la concentration de fructose-6-phosphate ainsi que celle de glucose-6-phosphate augmentent, inhibant l'hexokinase et diminuant ainsi le prélèvement de glucose.

Un deuxième site de régulation se situe au niveau de la pyruvate deshydrogénase. En effet, les composés cétoniques favorisent la production du lactate à partir du glucose et inhibent l'oxydation du lactate et du pyruvate.

Par rapport à d'autres composés comme l'insuline ou les acides gras non estérifiés, le β HB et l'ACA apparaissent comme étant les régulateurs clé de l'utilisation de glucose dans les tissus périphériques et plus particulièrement dans le cerveau (Robinson et Williamson, 1980). La modification de leurs concentrations dans le sang peut être considérée comme une adaptation rapide de l'organisme à des variations de l'état physiologique et affecte alors le métabolisme d'autres substrats comme le glucose et les acides gras.

L'augmentation des concentrations circulantes des composés cétoniques indique que l'apport en glucose au niveau cérébral est réduit et que le glucose doit être économisé. Le β HB et l'ACA peuvent alors se substituer au glucose comme substrats du métabolisme énergétique cérébral (Robinson et Williamson, 1980).

4.2. Métabolisme des acides aminés

L'ensemble des acides aminés sont présents dans le cerveau à des concentrations 6 à 8 fois plus élevées que celles mesurées dans le sang selon les espèces (McIlwain et Bachelard, 1985). Les taux cérébraux de la plupart de ces acides aminés sont relativement faibles à l'exception de ceux du glutamate, de la glutamine, de l'aspartate et du GABA qui représentent près de 70 % du pool des acides aminés libres du cerveau (Lajtha et coll., 1981 ; McIlwain et Bachelard, 1985).

Les acides aminés cérébraux peuvent être divisés en 3 groupes en fonction de l'évolution de leurs concentrations au cours des premières semaines de la vie postnatale (Agrawal et coll., 1966) :

1. le groupe des acides aminés qui présente une augmentation significative de leurs concentrations entre la naissance et l'âge adulte et qui comprend le glutamate, la glutamine, l'aspartate et le GABA.
2. le groupe des acides aminés dont les taux tissulaires diminuent au cours de la même période. Il s'agit de la leucine, l'isoleucine, la valine, la proline, la tyrosine et la phénylalanine.
3. les acides aminés qui ne présentent pas de variations significatives pendant la maturation cérébrale comme l'alanine ou la glycine.

La multiplication par 2 des taux tissulaires de glutamate et de glutamine entre 14 et 21 jours après la naissance correspond à la période où la compartimentation métabolique du système glutamate-glutamine se développe (Nehlig et Pereira de Vasconcelos, 1993, pour revue) ainsi qu'au moment où la conversion rapide du glucose dans les acides aminés devient effective (Gaitonde et Richter, 1966). De plus, l'activité des enzymes du métabolisme du glutamate augmente de façon importante au cours des 3 premières semaines de vie postnatale pour atteindre entre 20 et 25 jours les valeurs qui sont observées chez l'adulte (Bayer et McMurray, 1967).

Le glutamate, la glutamine, l'aspartate et le GABA dérivent des intermédiaires du cycle de Krebs et jouent un rôle important au niveau central en tant que neurotransmetteurs et précurseurs d'autres acides aminés (Lajtha et coll., 1981 ; McIlwain et Bachelard, 1985).

4.3. Modifications du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement

4.3.1. Maturation cérébrale et vulnérabilité du cerveau immature

Le développement du SNC chez les mammifères peut être défini comme une succession régulière de différents processus tout au long de la vie embryonnaire, foetale et postnatale (Morgane et coll., 1992 ; Rodier, 1980 ; Smart, 1991).

Après l'organogenèse, les processus cellulaires qui caractérisent le développement du cerveau sont complexes et comprennent : (1) la multiplication neuronale et gliale; (2) la migration des neurones vers leurs zones cibles; (3) l'agrégation des neurones entre eux pour former des structures cohérentes; (4) la différenciation et la maturation des neurones avec l'élongation et la myélinisation des axones et des dendrites; (5) la synaptogenèse avec la formation des circuits neuronaux et le développement de synapses fonctionnelles ainsi que la mise en place des mécanismes de synthèse des neurotransmetteurs; (6) la dégénérescence et la mort de certaines cellules dans l'ensemble du SNC tout au long de son développement.

L'ensemble de ces phénomènes a pour conséquence un accroissement de l'activité fonctionnelle cérébrale jusqu'au niveau qui caractérise le cerveau adulte (Morgane et coll., 1992).

La séquence de ces différents processus qui ont lieu au cours de la maturation du cerveau semble être la même chez tous les mammifères. Par contre, le moment où se produisent ces modifications peut varier en fonction des espèces et des régions cérébrales considérées (Morgane et coll., 1992 ; Rodier, 1980 ; Smart, 1991).

Ainsi, la phase de croissance rapide du cerveau qui est caractérisée par une augmentation importante du poids de cet organe du fait de la prolifération gliale et de la myélinisation est entièrement postnatale chez le rat alors qu'elle est périnatale chez l'homme, débutant vers la fin du second trimestre de gestation et se terminant 2 à 3 ans après la naissance (Dobbing, 1971).

La notion de vulnérabilité du cerveau immature est donc associée au fait qu'il existe, tout au long du développement, des périodes où le cerveau est particulièrement sensible à des modifications de son environnement ou à l'influence de drogues capables d'induire des déficits irréversibles lorsqu'elles surviennent pendant ces moments particuliers du développement cérébral. Dobbing (1971) suggère que la phase de croissance rapide du cerveau représente la période du développement cérébral la plus vulnérable à toute forme d'agression. Cependant, très récemment, différents auteurs (Morgane et coll., 1992 ; Smart, 1991) démontrent que le cerveau est sensible à n'importe quelle forme d'agression tout au long de sa période de maturation plutôt qu'à des moments précis de son développement.

Ainsi, le fait de considérer la seule phase de croissance rapide du cerveau comme période sensible de son développement ne prend pas en compte des phénomènes comme la multiplication et la migration des neurones qui se produisent avant cette période et qui apparaissent être très vulnérables à différents types d'agression.

Par ailleurs, le développement du cerveau met en jeu des mécanismes dont la mise en route peut dépendre de l'exécution préalable d'autres processus. Une atteinte à un moment précis du développement cérébral peut donc avoir des conséquences néfastes sur l'exécution des processus à venir et donc sur la maturation ultérieure d'une structure cérébrale, voire du cerveau entier. Par exemple, il existe au début de la vie foetale une courte période de prolifération gliale (Basco et coll., 1977 ; Swarz et Oster-Granite, 1978). Les cellules gliales ainsi générées sont impliquées dans le guidage de la migration des neurones vers leurs structures cibles. La perturbation de cette phase précoce de prolifération gliale du fait de l'exposition du cerveau à une agression quelconque peut avoir des conséquences non seulement sur la production de la glie elle-même mais aussi sur la migration des neurones et donc sur la formation des structures cérébrales vers lesquelles ces neurones sont censés migrer.

D'autre part, la nature et l'importance des déficits que peut engendrer une exposition du cerveau à une quelconque agression peuvent varier selon la période du développement au cours de laquelle le cerveau est exposé et selon la durée et l'intensité de cette agression (Morgane et coll., 1992 ; Smart, 1991). Par contre, les processus qui ont lieu au cours de la croissance cérébrale et qui sont terminés avant que ne survienne un quelconque traitement ne sont pas affectés (Smart, 1991).

4.3.2. Modifications du métabolisme énergétique cérébral au cours du développement : effets de l'hypothyroïdie, de la sous-alimentation et des anticonvulsivants

Un des événements les plus importants du développement cérébral chez le rat est le passage de l'utilisation des composés cétoniques et du glucose comme substrats du métabolisme énergétique cérébral pendant la période d'allaitement à une dépendance obligatoire vis-à-vis du glucose chez l'animal adulte (Cremer et Heath, 1974 ; Kraus et coll., 1974 ; Persson et coll., 1972). L'évolution de la conversion du glucose dans les acides aminés cérébraux et de la compartimentation métabolique du glutamate après administration de leucine-(U-¹⁴C) au cours du développement postnatal sont de bons indices de la maturation biochimique du cerveau et sont le reflet du développement de la coordination des différentes voies métaboliques qui caractérise le cerveau mature (Patel et Balazs, 1975).

Ces processus métaboliques sont très sensibles à des modifications de l'environnement du cerveau comme dans le cas de l'hypothyroïdie, de la sous-alimentation ou de l'exposition à certains médicaments comme les anticonvulsivants.

L'hypothyroïdie néonatale comme la sous-alimentation postnatale provoquent un retard de croissance cérébrale qui se traduit par un certain nombre de déficits neuromorphologiques comme une réduction de la taille des neurones, une diminution du nombre de synapses ainsi que des modifications au niveau des axones et des dendrites (Legrand, 1982 ; Winick et Noble, 1966).

Sur le plan métabolique, ces 2 phénomènes induisent une réduction de la conversion de la leucine-(U-¹⁴C) et de l'incorporation du carbone du glucose-(3-¹⁴C) dans les acides aminés cérébraux au cours du développement postnatal (Patel et Balazs, 1975).

Par contre, leurs effets sur la compartimentation métabolique en terme de rapport de radioactivité spécifique des différents acides aminés sont totalement différents. Ainsi, la radioactivité du pool cérébral de la leucine mesurée chez des animaux thyroïdectomisés est faible et le taux de conversion du carbone radioactif de la leucine-(U-¹⁴C) dans le glutamate et l'aspartate multiplié par 2. Par contre, celui concernant la glutamine et le GABA n'est pas modifié par l'hypothyroïdie (Cocks et coll., 1970). Ces résultats montrent qu'une insuffisance thyroïdienne induit au cours du développement postnatal une diminution de la capacité métabolique du cerveau ainsi qu'une réorganisation de la compartimentation métabolique des différents acides aminés.

A l'opposé, une sous-nutrition postnatale a pour conséquence une baisse du taux d'incorporation du carbone de la leucine-(U-¹⁴C) dans la glutamine, le glutamate et l'aspartate ainsi qu'une augmentation de la radioactivité du pool cérébral de la leucine (Patel et Balazs, 1975). En utilisant le glucose-(2-¹⁴C) en tant que précurseur de la synthèse des acides aminés, la sous-nutrition induit une diminution de la radioactivité spécifique des acides aminés qui dérivent du cycle de Krebs ainsi que du lactate et de l'alanine (Patel et Balazs, 1975). L'ensemble de ces résultats indique que la sous-nutrition postnatale induit un retard important de la maturation métabolique du cerveau qui se traduit à la fois au niveau de l'utilisation de différents substrats pour la synthèse des acides aminés et de la compartimentation métabolique de ces acides aminés.

Dans le cadre d'une exposition chronique précoce au PhB, les phénomènes observés au niveau cérébral sont très différents de ceux qui sont provoqués par une hypothyroïdie néonatale ou une sous-alimentation. Sur le plan morphologique, le PhB est capable de détruire dans l'hippocampe et le cervelet des neurones en prolifération comme ceux qui sont déjà formés (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et coll., 1979) alors que la sous-alimentation n'affecte la formation des neurones qu'au cours des périodes de prolifération. D'autre part, le PhB n'induit que des perturbations modérées de l'arborisation dendritique des cellules de

Purkinje par rapport à celles générées par une sous-nutrition. Sur le plan métabolique, le PhB semble maintenir le cerveau dans un état d'immaturité prolongé. Ainsi, une administration chronique précoce de PhB chez le rat induit à court terme une diminution de la conversion du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux ainsi qu'une augmentation simultanée du prélèvement cérébral de β Hb et de l'utilisation de ce substrat en tant que précurseur de la synthèse des mêmes acides aminés sans qu'il y ait modification de leurs concentrations tissulaires (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987 ; Pereira de Vasconcelos et coll., 1987 ; Schroeder et coll., 1991). L'utilisation accrue de β Hb par le cerveau chez les animaux traités au PhB est certainement le reflet des taux circulants élevés de composés cétoniques qui ont été mesurés chez ces animaux (Pereira de Vasconcelos et coll., 1987 ; Schroeder et coll., 1991).

En conclusion, la maturation du métabolisme énergétique cérébral est sensible à différents types d'agression, médicamenteuse ou autre. Cependant, les effets des BZD sur la maturation de différentes voies métaboliques du cerveau n'ont pas été étudiés à l'heure actuelle et font l'objet de la première partie de ce travail.

"Effects of early chronic diazepam treatment on incorporation of glucose and β -hydroxybutyrate into cerebral amino acids : relation to undernutrition."

H. Schroeder, A. Collignon, L. Uttscheid, A. Pereira de Vasconcelos, A. Nehlig

International Journal of Developmental Neuroscience, 1994 (sous presse)

La biosynthèse active des acides aminés à partir du glucose est la caractéristique fondamentale du métabolisme du cerveau mature *in vivo* (Gaitonde et coll., 1965). Cependant, cette voie métabolique ne devient active que vers le 14^{ème} jour de vie postnatale (Gaitonde et Richter, 1966) alors que le β HB est un précurseur actif de la biosynthèse des acides aminés cérébraux chez le rat immature (De Vivo et coll., 1975). Ces processus métaboliques sont très sensibles à divers types d'agression comme l'hypothyroïdisme (Cocks et coll., 1970), la sous-alimentation (Patel et Balazs, 1970) ou l'exposition à des médicaments comme le PhB (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987 ; Pereira de Vasconcelos et coll., 1987).

L'intérêt de ce travail est donc d'étudier les effets d'un traitement chronique précoce au DZ sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral et plus particulièrement sur la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose et du β HB.

Dans cette étude, des rats âgés de 5, 10, 14 et 21 jours ont reçu 2 h 30 après la dernière administration de DZ ou de véhicule une injection intrapéritonéale de glucose-(2-¹⁴C) ou de β HB-(3-¹⁴C). Trente minutes après, les animaux ont été sacrifiés par immersion dans l'azote liquide. Une fois congelés, les cerveaux ont été disséqués en 3 régions principales : le cortex, les aires sous-corticales et le cervelet. Pour chacune de ces régions, la fraction acido-soluble a été extraite par homogénéisation des tissus dans de l'acide perchlorique à 6 % avec un ultraturax. Après neutralisation avec de la potasse à 20 %, cette fraction a été purifiée par chromatographie échangeuse d'ions de manière à séparer la fraction du glucose non transformé, la fraction des acides aminés et celle des acides carboxyliques. La radioactivité de chacune de ces 3 fractions a été ensuite mesurée par comptage en scintillation liquide.

Puis, pour chaque extrait, la concentration tissulaire des différents acides aminés a été déterminée par CLHP et la radioactivité du glutamate, de la glutamine, de l'aspartate et du GABA mesurée par comptage en scintillation liquide après séparation bidimensionnelle par chromatographie sur couche mince. En obtenant ainsi le pourcentage de marquage dans chacun des acides aminés et la radioactivité spécifique de chaque acide aminé dans une fraction cérébrale donnée, il a été possible de déterminer l'influence d'un traitement chronique précoce au DZ à la fois sur les concentrations tissulaires et sur le flux dans les voies de synthèse des acides aminés.

Dans ce travail, les poids corporel et cérébral ainsi que les concentrations circulantes de glucose, β HB et ACA ont également été mesurés à 5, 10, 14 et 21 jours de vie postnatale chez les rats témoins et ceux exposés au DZ ainsi que dans un troisième groupe d'animaux qui ont été sous-alimentés. En effet, l'exposition chronique précoce au DZ induit un retard de croissance corporelle et cérébrale ainsi que des effets métaboliques qui peuvent être la conséquence d'une sous-alimentation liée à l'effet sédatif transitoire qu'exerce le DZ et/ou d'un effet direct du médicament. Ces rats sous-nutris ont été obtenus en augmentant l'effectif des portées de 12 à 16 animaux de manière à obtenir entre les témoins et les sous-nutris un

retard de croissance corporelle comparable à celui observé entre les animaux témoins et traités au DZ.

Un *t*-test de Bonferonni a été utilisé pour comparer, à chaque stade, les valeurs de poids corporel et cérébral, les glycémies et les concentrations de β HB et d'ACA mesurées dans les différents groupes d'animaux. Pour tous les résultats concernant la biosynthèse des acides aminés cérébraux, les valeurs des rats exposés au DZ ont été comparées, à chacun des âges étudiés, à celles obtenues chez les animaux traités avec le véhicule à l'aide d'un *t*-test de Student.

Le DZ induit une diminution significative de la glycémie par rapport aux témoins à tous les stades du développement postnatal étudiés sans que les concentrations sanguines de β HB et d'ACA soient modifiées.

L'administration de DZ induit une diminution de la conversion du glucose-(2- 14 C) dans les acides aminés cérébraux et une augmentation simultanée de la radioactivité de la fraction du glucose qui sont significatives à 5 et 10 jours de vie postnatale dans le cortex et les structures sous-corticales et à 5 jours dans le cervelet (*figure 12*). Par contre, à 14 et 21 jours, la répartition de la radioactivité du glucose-(2- 14 C) dans les différentes fractions de l'extrait acido-soluble n'est pas affectée par l'administration de DZ.

La répartition du marquage entre les différents acides aminés à partir du glucose-(2- 14 C) n'est pas modifiée chez les animaux traités au DZ à l'exception d'une augmentation de la radioactivité de la glutamine à 5 jours dans les 3 structures cérébrales étudiées (*figure 13a*). A partir du β HB-(3- 14 C), le DZ induit uniquement une diminution significative de la radioactivité de la glutamine à 5 et 10 jours d'âge postnatal dans le cortex (*figure 13b*) et à 5 jours dans les aires sous-corticales.

Les taux cérébraux des acides aminés et plus particulièrement de ceux impliqués dans la neurotransmission ne sont pas significativement affectés par le DZ dans le cortex et les structures sous-corticales au cours du développement postnatal. Par contre, dans le cervelet, l'exposition au DZ a pour conséquence une augmentation des concentrations cérébrales de leucine, sérine et thréonine à 5 et 10 jours de vie postnatale ainsi que de glycine et de GABA chez les animaux âgés de 10 et 21 jours.

Après injection du glucose-(2- 14 C), les radioactivités spécifiques des acides aminés cérébraux sont diminuées chez les animaux traités au DZ par rapport aux témoins entre 5 et 14 jours d'âge postnatal dans les structures sous-corticales et le cervelet mais ne sont pas modifiées dans le cortex au cours de la même période. Par contre, à 21 jours, le DZ induit une augmentation significative de la radioactivité spécifique de ces 4 acides aminés dans les trois structures cérébrales étudiées.

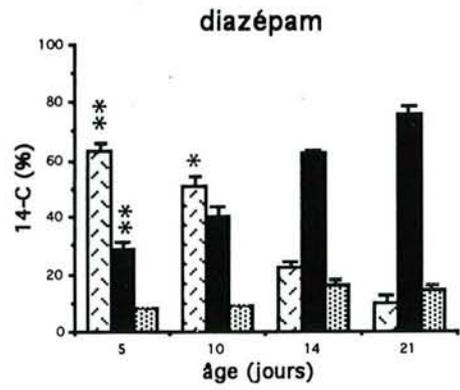
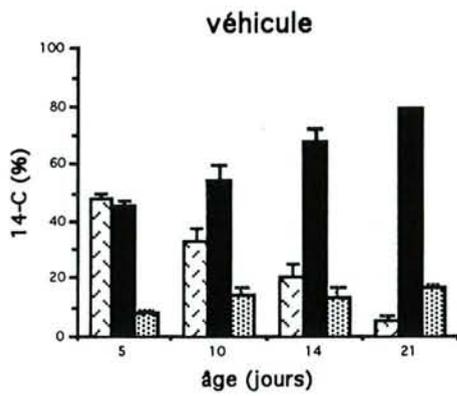
Avec le β HB-(3- 14 C) en tant que précurseur de la synthèse de ces acides aminés, le DZ provoque une augmentation significative de la radioactivité spécifique des acides aminés neurotransmetteurs aux stades les plus précoces comme celle du glutamate à 5 et 10 jours

dans le cortex et du GABA à 5 jours dans le cervelet. Par contre, à 14 et 21 jours, les radioactivités spécifiques mesurées chez les animaux exposés au DZ ne sont pas significativement différentes de celles observées chez les témoins.

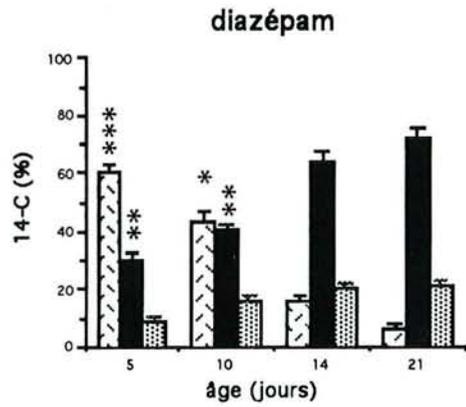
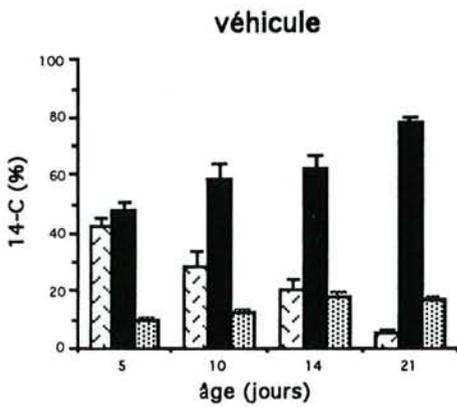
En conclusion, la biosynthèse des acides aminés cérébraux n'est sensible à un traitement chronique précoce au DZ qu'aux stades les plus immatures du développement, c'est-à-dire à 5 et 10 jours de vie postnatale. Cependant, ces modifications du métabolisme des acides aminés n'ont pas de conséquences significatives sur leurs concentrations dans le cerveau. A 14 et 21 jours, l'administration de DZ n'a plus de conséquences sur la biosynthèse des acides aminés cérébraux, ce qui suggère le développement d'une tolérance vis-à-vis du traitement. Mais ce phénomène pourrait être également le reflet de la forte diminution des concentrations plasmatiques et cérébrales de DZ qui est observée entre 14 et 21 jours (cf. chapitre 2).

D'autre part, les effets du DZ sur la maturation cérébrale chez le rat ne semblent pas être liés à une sous-alimentation. En effet, à l'inverse de ce qui est observé avec le DZ, la sous-nutrition n'induit pas de variation du poids du cerveau par rapport aux rats traités avec le véhicule entre 5 et 21 jours de vie postnatale alors qu'elle provoque une réduction significative du poids corporel au cours de la même période. De plus, les animaux sous-nutris ont des taux circulants de β HBA et d'ACA qui sont augmentés de 2 à 4 fois par rapport à ceux mesurés chez les témoins entre 5 et 14 jours alors qu'ils ne sont pas modifiés chez les rats traités avec le DZ. L'évolution postnatale du poids du cerveau, de la glycémie et des taux circulants des composés cétoniques chez les animaux exposés au DZ est donc totalement différente de celle observée dans le cas d'une sous-alimentation, indiquant que les effets d'une administration chronique précoce de DZ sur la maturation cérébrale sont directs et non médiés par une sous-nutrition qui résulterait de la sédation transitoire que peut induire cette drogue.

CORTEX



STRUCTURES SOUS-CORTICALES



CERVELET

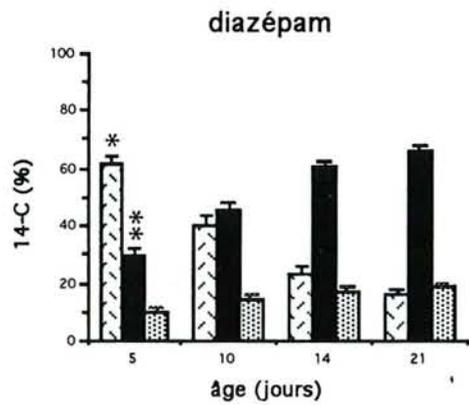
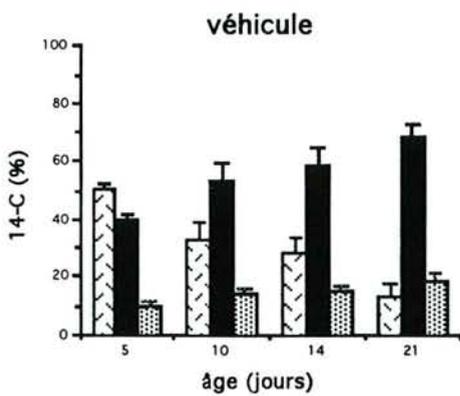
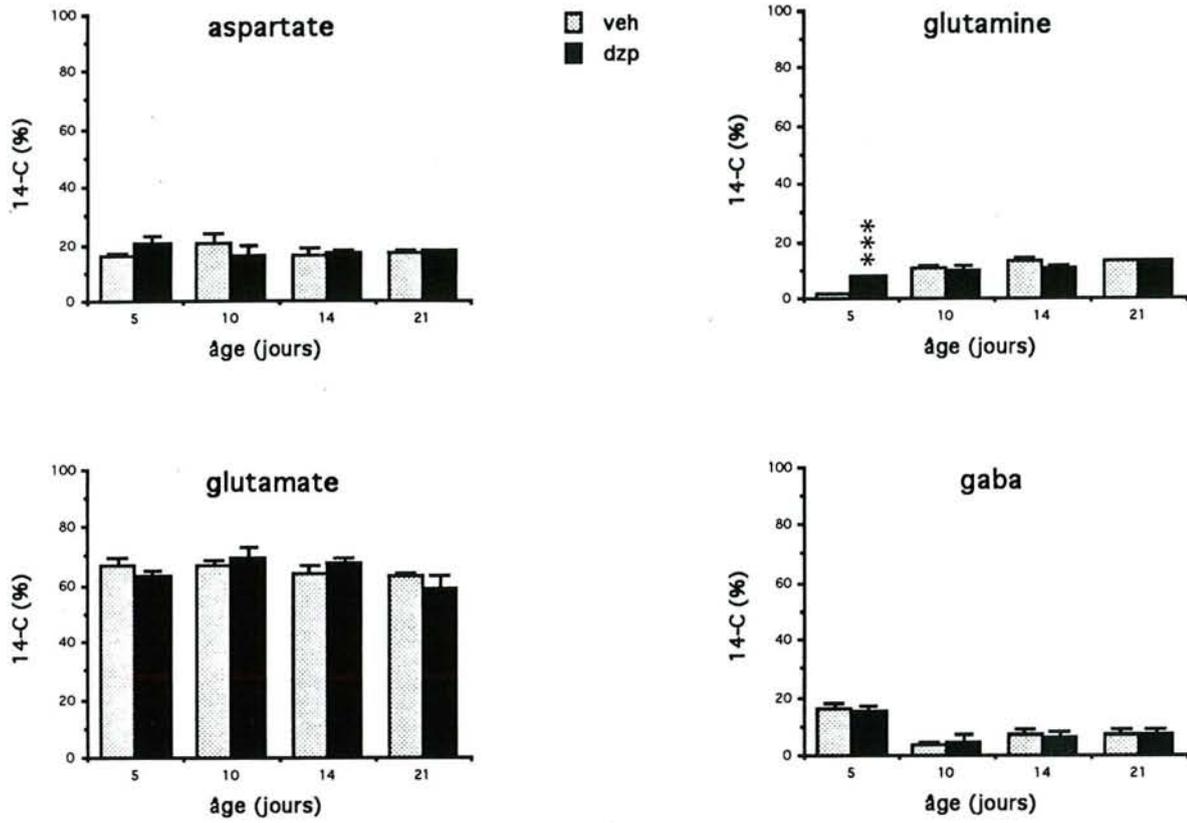


figure 12 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur la distribution du ^{14}C du glucose-(2- ^{14}C) entre les fractions glucose (glu), acides aminés (aa) et acides carboxyliques (ac) dans le cortex, les structures sous-corticales et le cervelet au cours du développement postnatal chez le rat.

Les valeurs exprimées en pourcentage de ^{14}C représentent les moyennes \pm e.s.m. de 3 à 4 expériences.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (*t*-test de Student)

CORTEX (glucose)



CORTEX (β -hydroxybutyrate)

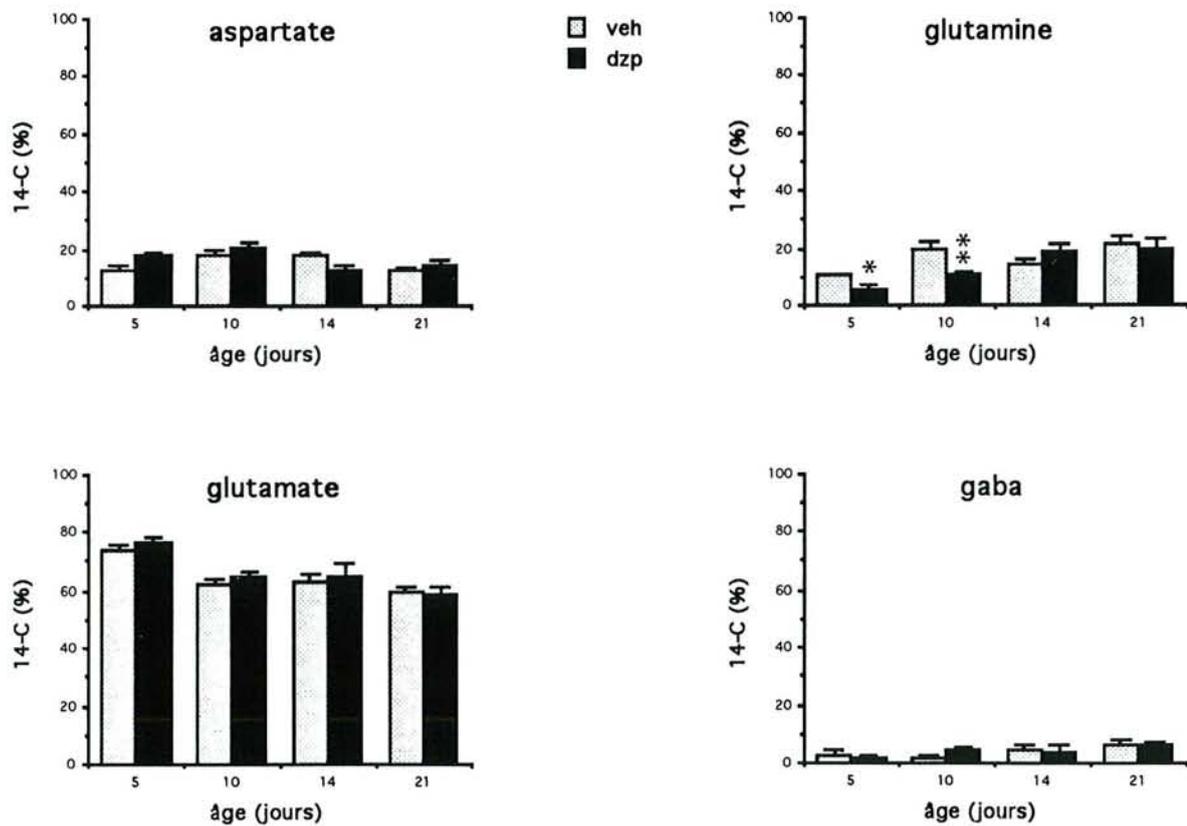


figure 13a : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur la répartition du ^{14}C entre les différents acides aminés à partir du glucose-(2- ^{14}C) dans le cortex cérébral.

Les valeurs exprimées en pourcentage de ^{14}C représentent les moyennes \pm e.s.m. de 3 à 4 expériences.

*** $p < 0,001$, différence statistiquement significative par rapport aux témoins (*t*-test de Student)

Abréviations : dzp = diazépam, veh = véhicule

figure 13b : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur la répartition du ^{14}C entre les différents acides aminés à partir du β -hydroxybutyrate-(3- ^{14}C) dans le cortex cérébral.

Les valeurs exprimées en pourcentage de ^{14}C représentent les moyennes \pm e.s.m. de 3 à 4 expériences.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives par rapport aux témoins (*t*-test de Student)

Abréviations : dzp = diazépam, veh = véhicule

EFFECTS OF EARLY CHRONIC DIAZEPAM TREATMENT ON INCORPORATION OF GLUCOSE AND β -HYDROXYBUTYRATE INTO CEREBRAL AMINO ACIDS: RELATION TO UNDERNUTRITION

HENRI SCHROEDER,* ALAIN COLLIGNON, LAURENT UTTSCHIED,
ANNE PEREIRA DE VASCONCELOS and ASTRID NEHLIG
INSERM U272, Université de Nancy I, 30 rue Lionnois, B.P. 3069, 54013 Nancy-Cedex, France

(Received 22 September 1993; revised 22 March 1994; accepted 5 April 1994)

Abstract—The effects of early chronic diazepam (DZP) exposure on blood glucose and ketone body concentration and glucose and β -hydroxybutyrate (β HB) utilization for regional cerebral amino acid biosynthesis were studied in suckling rats. The animals were treated from postnatal day 2 (P2) to 21 (P21) by a daily subcutaneous injection of 10 mg/kg DZP or of the dissolution vehicle and studied at P10, P14 and P21, together with an additional group of food-restricted rats obtained by an increase in litter size. DZP treatment induced a 9–26% decrease in body and brain weight. Undernutrition decreased body weight by 20–24% at all ages whereas brain weight was relatively spared. DZP and N-desmethyldiazepam concentrations decreased with age and were cleared from brain and plasma by 6–8 hrs after the injection. DZP decreased plasma glucose concentrations by 6–12% at P5, P14 and P21, whereas undernutrition did not change plasma glucose concentrations, except for a 7% decrease at P14. DZP treatment had no consequences on circulating concentrations of both ketone bodies while undernutrition increased their concentration by 45–362% at all ages. The conversion of [14 C]glucose into cerebral amino acids was reduced by DZP at P5 and P10. The cerebral concentration of neurotransmitter amino acids was not affected by DZP treatment which only increased the amount of neutral amino acids mainly in the cerebellum at P5 and P10. After [U- 14 C]glucose injection, specific radioactivities of cerebral amino acids were mostly decreased by DZP from P5 to P14 and significantly increased at P21. With [3- 14 C] β HB as a precursor, specific radioactivities of neurotransmitter amino acids were increased by DZP. In conclusion, P5 and P10 rats appear to be most sensitive to DZP effects whereas some tolerance to the drug seems to develop by P21. The lack of effects of DZP on blood ketone body concentrations compared to food restriction as well as the relative sparing of brain weight in undernourished rats confirms that the cerebral metabolic consequences of early DZP exposure on brain energy metabolism are mostly direct effects not mediated by sedation-induced undernutrition.

Key words: energy metabolism; glucose; ketone bodies; amino acids; development; diazepam; benzodiazepines; chronic treatment; undernutrition.

Diazepam (DZP) has anxiolytic, sedative, hypnotic and anticonvulsant properties and is largely administered to neonates and epileptic women, even during pregnancy, for prophylaxis and treatment of convulsive seizures.^{1,8} Early anticonvulsant treatment has adverse effects on the developing brain which is particularly vulnerable to injury when neurons and glial cells are proliferating, migrating, and differentiating.⁷ All anticonvulsant drugs cross the placenta and accumulate in breast milk, causing undesirable effects such as poor weight gain, drowsiness and adverse effects on psychomotor development.²⁴ As a consequence of clinical administration, DZP has been associated with a number of complications in the newborn infant known as the “floppy infant syndrome”.¹⁹

Animal studies have shown that perinatal exposure to various benzodiazepines induces a decrease in body and brain weight^{9,10,14,42} and long-lasting morphological changes.¹⁶ Perinatal exposure to benzodiazepines leads also to a variety of short- and long-term behavioral and biochemical changes in animals, including behavioral disturbances,^{9,10,14,36,38} perturbations of neurotransmitter concentrations²¹ and uptake in the rat brain.¹⁵ However, the effects of early DZP exposure on energy metabolism of the developing brain have not been studied.

The rapid and important incorporation of glucose carbon into cerebral amino acids develops sharply at the so-called “critical period” from 10 to 15 days after birth in the rat¹⁷ during which the cortex becomes functionally mature.¹² This metabolic pathway is an index of cerebral functional

*Author to whom all correspondence should be addressed.

maturation and its impairment may result in changes in neurotransmitter amino acid and protein synthesis which could be deleterious to brain function. Moreover, in the immature rat, ketone bodies, β -hydroxybutyrate (β HB) and acetoacetate (ACA), are actively taken up by the brain^{22,25,38} and act as alternate substrates to glucose for both energy metabolism,³ amino acid^{4,5,35} and lipid biosynthesis.^{33,44}

Previous reports from our laboratory have shown that a chronic postnatal exposure of rats to another anticonvulsant drug, phenobarbital, leads to alterations of circulating concentrations of glucose and ketone bodies which in turn translate into a change in the balance of cerebral energy metabolism in the immature rat brain.^{34,35} These changes induce a decrease in the rate of glucose utilization for cerebral amino acid biosynthesis and a simultaneous increase of the efficiency of β -hydroxybutyrate as a precursor for cerebral amino acids, with no change in brain amino acid concentrations.^{34,35}

Therefore, the purpose of the present study was to examine the relationship between an early chronic postnatal exposure to DZP, circulating concentrations of glucose and ketone bodies, the development of selected neurotransmitter amino acids and the maturation of the incorporation of glucose and β HB into amino acids in the suckling rat brain. The rats have been treated daily by DZP from postnatal day 2 to day 21 to encompass most of their cerebral maturation phases. In addition, to discriminate whether the effects of DZP are direct effects or partly related to sedation-induced undernutrition, we studied a third group of rats whose body weight was decreased to the same extent by undernutrition as by DZP.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals and pharmacological treatment

Two adult female Sprague-Dawley rats and one male were mated together for seven days. The animals were maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 hr light/dark cycle (lights on at 06:00 hr). Food and water were available *ad libitum*. After delivery, litter size was reduced to 12 pups for homogeneity. Rat pups received a daily subcutaneous injection of DZP ("Valium 10 mg/2 ml" injectable ampoules, Roche, Neuilly-sur-Seine, France) at the dose of 10 mg/kg from day 2 to 21 (day of birth was considered as day 0). Control animals received an equivalent volume of the dissolution vehicle (propylene glycol, 40%; ethanol, 10%; benzyl alcohol, 1.5%; sodium benzoate, 5%). The pharmacological treatment was the same inside each litter, either vehicle or DZP for all animals so as to have equal size pups in each litter and to prevent the mother from rejecting the low-weighted DZP-treated rats. However, to avoid a litter effect, the experiments were performed on a minimal number of three different litters for each treatment and age studied. The animals were injected between 08:30 and 09:30 a.m. and the experiments were performed about 2.5 hrs later, i.e. between 11:00 and 12:00 a.m. Rats were studied for developmental ages, at 5 (P5), 10 (P10), 14 (P14) and 21 (P21) days after birth. In addition, to control whether metabolic changes could be attributed, at least partly to undernutrition resulting from DZP-induced sedation, an additional group of 5-21-day-old rats was studied. In that group, the size of the litters was increased to 16 pups in order to achieve the same weight reduction as in the DZP-exposed group.

Body and brain weight were controlled on all complete litters. For all other parameters, usually different measurements were performed on the same litter, such as blood concentrations of glucose, ketone bodies and DZP, brain amino acid and DZP concentrations or incorporation of both radioactive tracers into cerebral amino acids. Brains or blood samples of several animals were pooled, usually four to five at P5, three at P10 and P14 and two at P21. All experimentation was conducted in conformity with the 'Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings'.

Circulating glucose and ketone body measurement

For plasma glucose measurements, blood samples were collected after decapitation of the animals and were immediately centrifuged. Plasma glucose concentrations were measured on 10 μ l samples in a Beckman glucose analyzer.

For the assessment of circulating ketone body concentrations, blood samples were collected after decapitation into preheparinized glass dishes and were immediately deproteinized by chilled 10% (v/v) perchloric acid. After centrifugation at 3000 g for 15 min at 4°C, the supernatant solutions were neutralized by 20% KOH and used for the spectrophotometric enzymatic determination of β HB⁴³ and ACA,³⁰ with a Bausch and Lomb spectrophotometer, model Spectronic 2000 (Bausch and Lomb, Analytical System Divisory, Rochester, U.S.A.). For the measurement of β HB and ACA, blood samples from two to five animals were pooled.

Plasma and cerebral diazepam measurement

Preparation of plasma and brain extract. Rat pups were sacrificed by decapitation at 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 and 24 hrs after drug administration. Heparinized blood samples were immediately centrifuged, and the plasma removed and stored at -80°C until use. Simultaneously, the head was immediately frozen in liquid nitrogen. Whole brains were dissected in a cold room at 4°C and homogenized in four volumes of sodium phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) by means of an ultra-turax. Triton X-100 (0.1% v/v) was added and brain samples were centrifugated at 30,000 g for 20 min at 0°C. The extraction was repeated a second time and the supernatants were pooled and stored at -80°C until use.

Measurement of diazepam and its metabolite N-desmethyldiazepam. The concentrations of these compounds were determined by a modification of the methods of Kabra *et al.*²³ and Vree *et al.*⁴¹ Flunitrazepam was added to each plasma (0.1 ml) or brain extract (1.0 ml) as internal standard. Then, 1 ml ammonium chloride buffer (6 M, pH 9.5) and diethylether (4 ml) were added to the extract which was mixed vigorously in a mechanical shaker for 10 min and centrifuged at 2200 g for 5 min. The ether layer was evaporated to dryness under a stream of nitrogen and the residue dissolved in 50 μ l acetonitrile just before analysis. To obtain calibration curves, drug-free plasma and brain extract spiked with standard DZP, N-desmethyldiazepam and the internal standard were subjected to the same extraction procedure.

A high performance liquid chromatograph (Varian, model 5020) with a variable-wavelength ultraviolet detector was used. Twenty μ l samples were injected into a reverse-phase column (Nova Pack C18, 15 cm \times 3.9 mm I.D., particle size 4 μ m, Waters, Milford, Massachusetts, U.S.A.). The column was eluted with acetonitrile-sodium acetate buffer (0.01 M, pH 4.6) (35:65, v/v) at the rate of 2.0 ml/min and the column effluent was monitored at 240 nm. Concentrations of DZP and N-desmethyldiazepam were calculated by their peak height ratio with the internal standard.

Administration of [¹⁴C]glucose and of [^{3-¹⁴C}] β HB

At the age of P5, P10, P14 or P21, control and DZP-treated animals received an intraperitoneal injection of 0.26-0.37 MBq/100 g body weight of [¹⁴C]glucose (spec. act. 109 GBq/mmol, Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) or of [^{3-¹⁴C}] β HB (spec. act. 0.37-1.3 GBq/mmol, New England Nuclear, Boston, U.S.A.). The animals were returned to their usual environment, back to their mother for suckling animals and allowed food and water *ad libitum*. Thirty minutes after the administration of each tracer, the animals were killed by decapitation followed by immediate immersion of the head into liquid nitrogen at P21, or by immersion of the whole body into liquid nitrogen at P5, P10 and P14. Thereafter, the heads or bodies were kept at -80°C.

Treatment of the tissues

The brains were dissected out into three parts, cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum in a cold room at 2°C. According to the age, the brains of two to five animals were pooled. Brain acid-soluble material was obtained after extraction in 6% (v/v) perchloric acid (5 ml/g of brain tissue). The three fractions (glucose, amino acids and carboxylic acids) were then purified by passage through a cation-exchange resin (Amberlite IRN-77, H⁺ form) and an anion-exchange resin (Dowex 2, formate form), as previously described.^{34,35}

Treatment of the amino acid fraction

The concentration of the different amino acids was determined by means of an amino acid analyzer (Beckman, model 7300) using 2-aminoethyl-L-cysteine as internal standard. The radio-

activity of four different amino acids (glutamate, glutamine, aspartate and GABA) was measured after a bidimensional separation on thin layer chromatography, as previously described.^{34,35} The radioactivities of the individual amino acids were measured using a Beckman scintillation counter, model LS 1801. The concentration and the radioactivity of the individual amino acids were determined on two different aliquots of the same experimental sample, allowing the calculation of specific radioactivities of amino acids, expressed as dpm/nmol of amino acid.

Statistical analysis

For the statistical analysis, plasma concentrations of glucose and ketone bodies from control, DZP-exposed and undernourished rats underwent first a two-way analysis of variance followed by Bonferroni's *t*-test for multiple comparisons. Data concerning the incorporation of glucose into the different acido-soluble fractions and concentrations of amino acids of the DZP-treated animals were compared with those of the control group by means of two-way analysis of variance followed by a two tailed Student's *t*-test.

RESULTS

General effects of diazepam treatment

There was no significant difference in the rate of mortality between vehicle- and DZP-treated rats, demonstrating that the 10 mg/kg DZP daily dose used in the present study was below the LD₅₀ for this drug in the immature rat. The early exposure of rat pups to DZP did not induce prominent differences in physical maturation signs and general behavior. In the youngest pups (until P10), DZP administration induced a transient sedation which lasted 2–3 hrs on the first few days and was progressively reduced with maturation. During that sedation period, DZP-exposed pups did not suck; later in the day, the frequency of sucking was not different in control and DZP-exposed rats. From P10 to 21, when the circulating concentration of DZP was reduced, locomotor activity and general exploratory behavior of the rats was no longer affected by drug administration.

Body and brain weight

The two-way analysis of variance showed that the effects of age and treatment were highly significant ($P=10^{-4}$) for both body and brain weight. The interaction between age and treatment was significant only for body weight ($P=10^{-4}$). The administration of DZP induced a 9–11% statistically significant decrease in body weight of DZP-treated animals compared to controls at all ages studied (Fig. 1a). Undernutrition induced a significant decrease in body weight at all ages which ranged from 20 to 24% compared to control values and which was not different from the decrease in body weight resulting from postnatal DZP exposure. The pharmacological treatment also induced a significant 9–26% reduction in brain weight of DZP-exposed animals at the four ages studied. In undernourished pups, brain weight was significantly decreased only at P5 and P21 by 12 and 4%, respectively, and was significantly different from DZP-exposed rats at P5, P14 and P21 (Fig. 1b).

Plasma diazepam and N-desmethyldiazepam concentrations

DZP concentrations in plasma were highest at P5, reaching 1.19 µg/ml at 1 hr after drug injection (Fig. 2). Peak concentrations of DZP were recorded at 1 hr after the injection from P5 to P14, whereas at P21, drug concentrations peaked at 2 hrs. Plasma drug concentrations at 1 hr decreased progressively with development, reaching at P10 and P14 57–59% of the maximal concentrations recorded at P5 and by P21 only 16% of the values at P5. From P5 to P14, DZP concentrations were not detectable in plasma at 6 hrs after injection whereas DZP had already been cleared from plasma by 4 hrs at P21. Plasma concentration of the metabolite, *N*-desmethyldiazepam reached peak concentrations at 1 hr after DZP injection from P10 to P21 and at 2 hrs at P5. Peak concentrations of *N*-desmethyldiazepam reached 21–46% of peak DZP concentrations from P5 to P14 and 248% of DZP levels at P21. *N*-desmethyldiazepam was cleared of the plasma by 8 hrs at all ages.

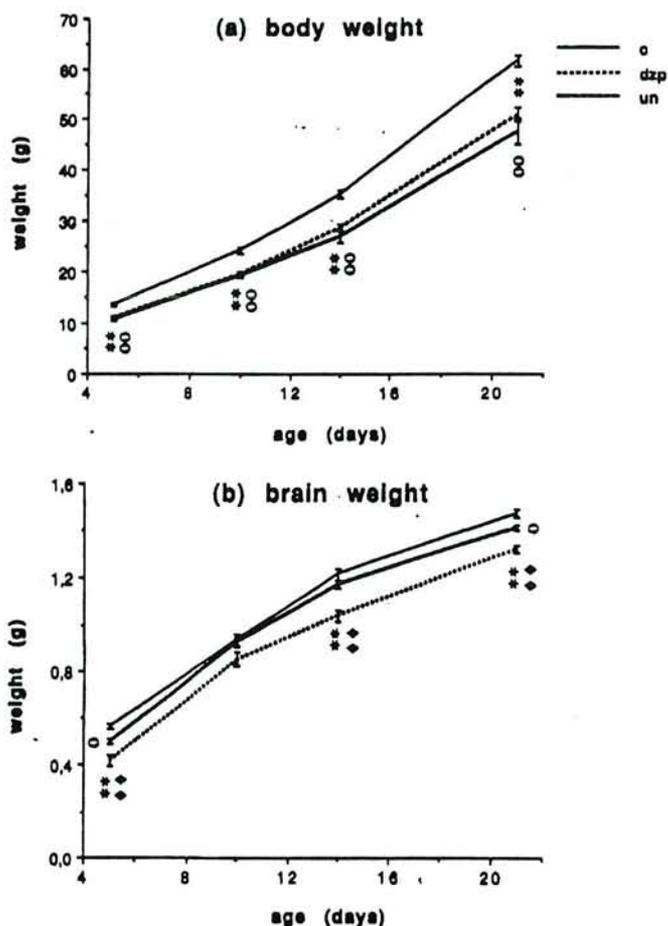


Fig. 1. Effects of DZP and undernutrition on postnatal evolution of body (a) and brain weight (b). Values, expressed as g, are means \pm S.E.M. of 10–22 litters of 12 animals each for body weight and of 6–10 animals for brain weight. Abbreviations: c: controls, dzp: diazepam, un: undernutrition. ** $P < 0.01$, statistically significant difference between control and DZP-treated animals (Bonferroni's *t*-test). ○ $P < 0.05$, ○ ○ $P < 0.01$, statistically significant differences between control and undernourished animals (Bonferroni's *t*-test). ♦ $P < 0.01$, statistically significant difference between undernourished and DZP-exposed animals (Bonferroni's *t*-test).

Cerebral diazepam and *N*-desmethyldiazepam concentrations

DZP concentrations in brain were highest at P10 and P14 at which ages they reached peak concentrations 1 hr after injection (Fig. 3). At P5 and P21, peak concentrations of the drug were reached at 2 hrs. At P21, DZP was cleared from the brain by 3 hrs, whereas at earlier ages, DZP was not detectable in brain only by 6 hrs after injection. Brain concentrations of *N*-desmethyldiazepam reached at 1 hr 21–25% of DZP concentrations at P5 and P10 and 16% at P14. As for DZP, peak concentrations of the metabolite were reached at 1 hr after DZP injection at P10 and P14 and 2 hrs after DZP at P5. At P21, *N*-desmethyldiazepam was totally absent from brain at all times. *N*-desmethyldiazepam was completely cleared from the brain at 6 hrs at P14 and at 8 hrs at P5 and P10 (Fig. 3).

Circulating glucose and ketone body concentrations

As shown in Fig. 4, plasma glucose concentrations increased by 16–25% between P5 and P21 in the three groups of rats. In DZP-exposed animals, plasma glucose concentrations were significantly decreased by 6–12% compared to controls at P5, P14 and P21. The effects of age and treatment were highly significant ($P = 10^{-4}$) and there was no interaction between age and treatment (two-way analysis of variance). In undernourished rats, plasma glucose concentration was only significantly reduced under control values by 7% at P14 while it was unchanged at all other ages. Furthermore,

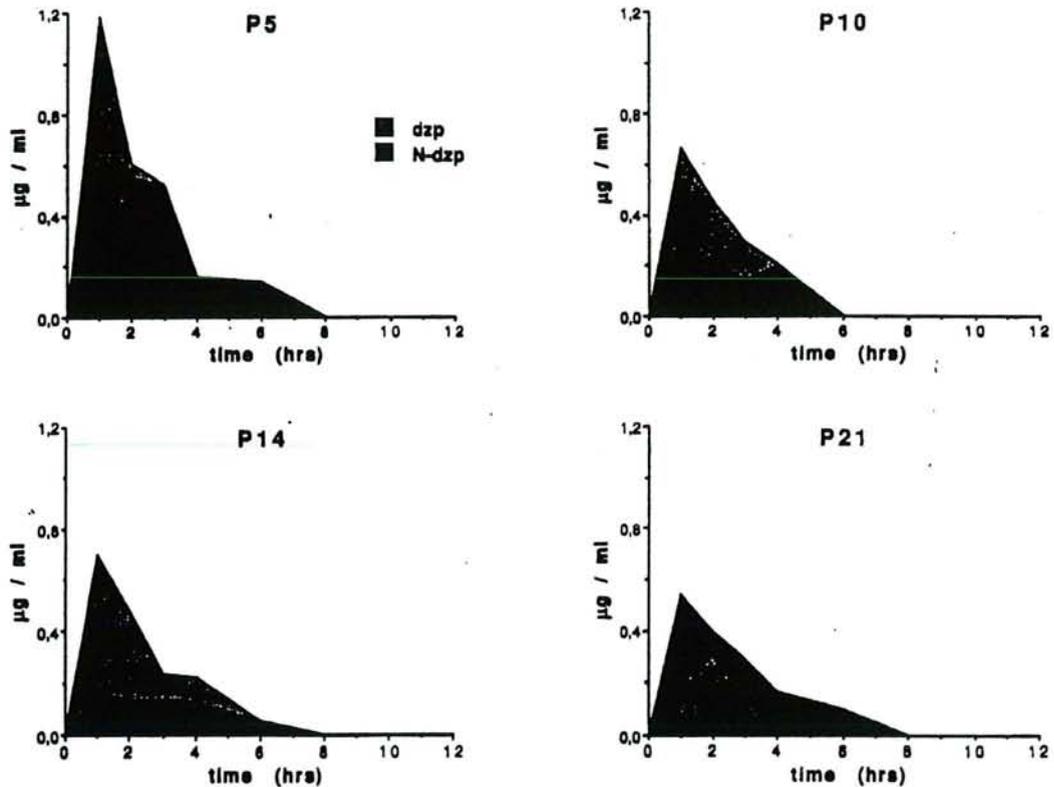


Fig. 2. Evolution over time in plasma concentration of diazepam (dzp) and its main metabolite, *N*-desmethyldiazepam (*N*-dzp), expressed as $\mu\text{g/ml}$ in P5–P21 rats. Values, expressed as $\mu\text{g/ml}$, are means of three to five animals.

plasma glucose concentrations were significantly higher in undernourished rats than in DZP-exposed animals at P5.

Blood concentrations of βHB and ACA ranged from 0.50 to 0.57 and 0.28 to 0.38 mmol/l in control P5–P14 rats, respectively, and decreased two-fold at P21. DZP treatment did not affect βHB and ACA blood concentrations (Fig. 5), except for a 42% increase in ACA blood concentration at P5. The data of the two-way analysis of variance showed that the effects of age and treatment were highly significant for the two ketone bodies ($P=10^{-4}$), but there was an interaction between age and treatment for βHB and ACA ($10^{-4} < P < 4 \times 10^{-2}$). Undernutrition increased blood amounts of ACA by 45–60% and those of βHB by 103–362% over control values at all ages. These increases were statistically significant compared to control concentrations for both ketone bodies at all ages, except at P21 for βHB . Blood concentrations of ketone bodies were also significantly higher in undernourished than in DZP-treated rats at P10 and P14 for ACA and at P5, P10 and P14 for βHB (Fig. 5).

Distribution of ^{14}C into the different fractions of the acid-soluble extract after the administration of $[\text{U}-^{14}\text{C}]$ glucose

As shown in Fig. 6 for cerebral cortex, in control as in DZP-treated animals, the percentage of labeling in glucose fraction decreased with age while the percentage of radioactivity in amino acid fraction increased to reach the highest value at P21. The administration of DZP induced an increase in the percentage of labeling in the glucose fraction with a simultaneous decrease in the amino acid fraction, significant at P5 and P10 and not affected at P14 and P21. The radioactivity in the carboxylic acid fraction was low at all ages and not affected by the pharmacological treatment. A similar pattern of effects of DZP on glucose incorporation into cerebral amino acids was found in subcortical areas and cerebellum (data not shown).

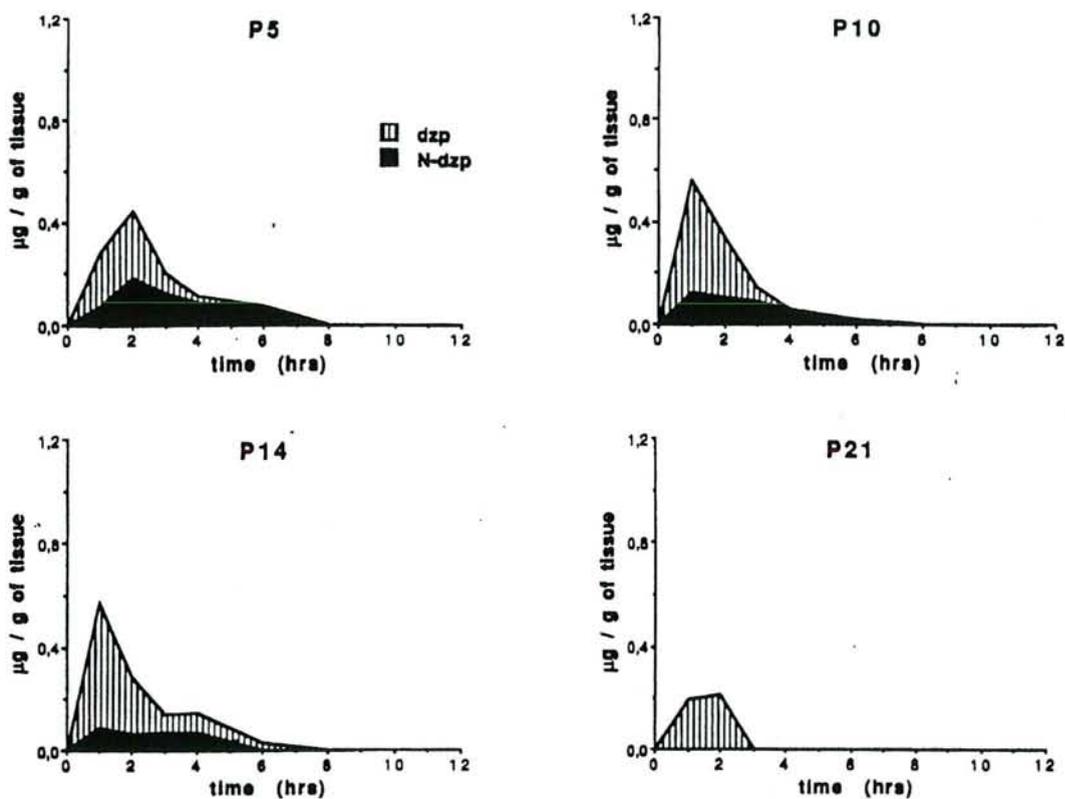


Fig. 3. Evolution over time in cerebral concentration of diazepam (dzp) and its main metabolite, *N*-desmethyldiazepam (*N*-dzp), expressed as $\mu\text{g/ml}$ in P5-P21 rats. Values, expressed as $\mu\text{g/g}$ of tissue, are means of three to five animals.

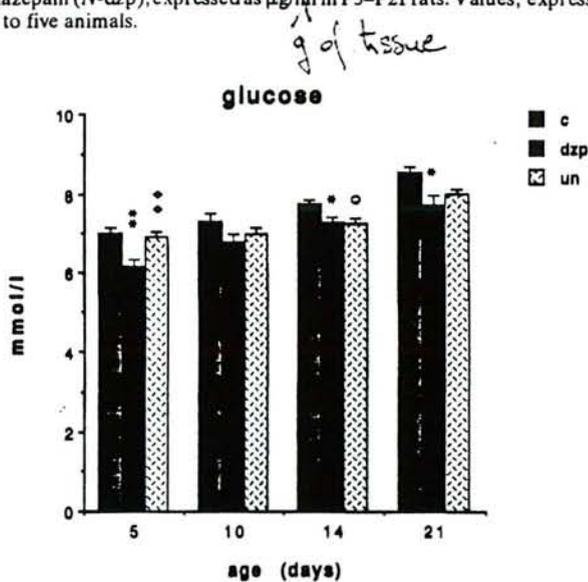


Fig. 4. Effects of DZP and undernutrition on the postnatal evolution of plasma glucose concentration in P5-P21 rats. Values, expressed as mmol/l are means \pm S.E.M. of six to nine animals. Abbreviations: c: controls, dzp: diazepam, un: undernutrition. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, statistically significant differences between control and DZP-treated animals (Bonferroni's *t*-test). \circ $P < 0.05$, statistically significant difference between control and undernourished animals (Bonferroni's *t*-test). \blacklozenge $P < 0.01$, statistically significant difference between undernourished and DZP-exposed animals (Bonferroni's *t*-test).

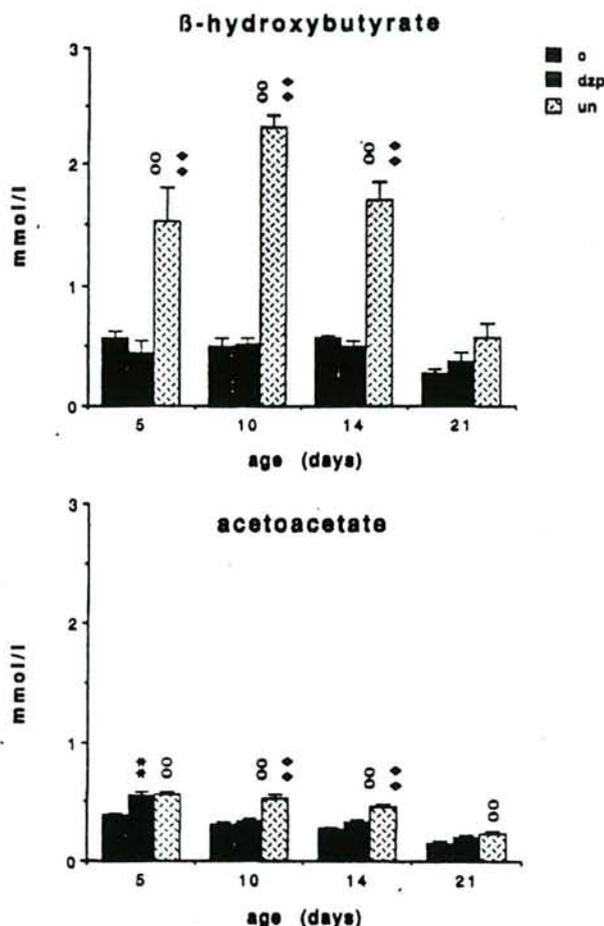


Fig. 5. Effects of DZP and undernutrition on the postnatal evolution of circulating concentrations of β -hydroxybutyrate and acetoacetate in P5-P21 rats. Values, expressed as mmol/l, are means \pm S.E.M. of four to 10 animals. Abbreviations: c: controls, dzp: diazepam, un: undernutrition. ** $P < 0.01$, statistically significant difference between control and DZP-treated animals (Bonferroni's *t*-test). OO $P < 0.01$, statistically significant differences between control and undernourished animals (Bonferroni's *t*-test). ◆◆ $P < 0.01$, statistically significant difference between undernourished and DZP-exposed animals (Bonferroni's *t*-test).

Cerebral amino acid concentrations

The concentration of the aspartate, glutamate, glutamine, leucine, valine and GABA in cerebral cortex reached a value at P5 of about 55–80% of their respective concentration at P21, whereas the other neutral amino acids, alanine, glycine, serine, and threonine reached at P5 98–280% of their respective concentration at P21 (Table 1). In the cerebellum, the concentration of all amino acids at P5 ranged from 23 to 84% of their respective concentrations at P21, except for alanine, glycine and threonine which reached at P5 98–125% of their concentration at P21. According to the analysis of variance, the effect of age was significant for most amino acid concentrations in the two brain regions ($10^{-4} < P < 0.03$), with the exception of leucine, serine and GABA in the cerebral cortex and of glycine, leucine and valine in the cerebellum.

The pharmacological treatment did not change amino acid concentrations in the cerebral cortex, as confirmed by the analysis of variance, except for glutamine at P21 which concentration was decreased by 16% compared to control values. Conversely, in the late maturing cerebellum, DZP treatment induced increases in amino acid concentrations, as confirmed by the two-way analysis of variance with a significant effect of the treatment for aspartate, glutamate, glycine, threonine and GABA ($0.003 < P < 0.04$). DZP-induced increases ranged from 34 to 119% and affected leucine, serine and threonine at P5, glutamine, glycine, serine and GABA at P10, and glycine and GABA

CEREBRAL CORTEX

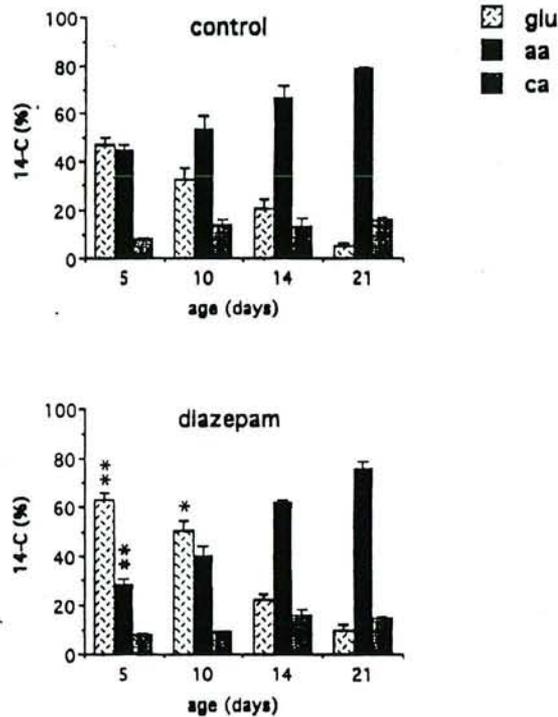


Fig. 6. Effects of DZP on the distribution of radioactivity between the three fractions of the acid-soluble extract, i.e. glucose (glu), amino acids (aa) and carboxylic acids (ca) in cerebral cortex of P5–P21 rats. Values are means \pm S.E.M. of four to six experiments. * P < 0.05, ** P < 0.01, statistically significant differences from controls (Student's t -test).

Table 1. Influence of diazepam on amino acid concentration in cerebral cortex and cerebellum of developing rats

	5 days		10 days		14 days		21 days	
	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam
Cortex								
Alanine	515 \pm 46	434 \pm 14	359 \pm 33	342 \pm 41	544 \pm 36	461 \pm 77	394 \pm 24	387 \pm 22
Aspartate	1550 \pm 119	1608 \pm 58	1723 \pm 95	2103 \pm 168	2356 \pm 91	2810 \pm 210	2769 \pm 45	2742 \pm 276
Glutamine	1125 \pm 83	998 \pm 117	1177 \pm 75	1103 \pm 116	1251 \pm 56	1427 \pm 135	1672 \pm 6	1404 \pm 86*
Glutamate	4450 \pm 279	4097 \pm 156	4615 \pm 318	4565 \pm 504	6940 \pm 130	6629 \pm 559	8068 \pm 204	7637 \pm 863
Glycine	847 \pm 98	884 \pm 28	486 \pm 83	606 \pm 93	445 \pm 15	426 \pm 53	303 \pm 11	320 \pm 29
Leucine	55 \pm 4	70 \pm 4*	47 \pm 7	48 \pm 5	60 \pm 11	66 \pm 15	69 \pm 4	54 \pm 8
Serine	758 \pm 95	836 \pm 63	738 \pm 43	812 \pm 87	861 \pm 101	1050 \pm 124	774 \pm 55	874 \pm 69
Threonine	643 \pm 49	658 \pm 17	492 \pm 45	486 \pm 53	543 \pm 13	541 \pm 48	305 \pm 16	331 \pm 40
Valine	55 \pm 4	56 \pm 6	49 \pm 4	38 \pm 9	58 \pm 8	79 \pm 18	78 \pm 5	70 \pm 12
GABA	825 \pm 94	1010 \pm 94	806 \pm 79	830 \pm 99	1017 \pm 38	957 \pm 135	1078 \pm 76	1020 \pm 118
Cerebellum								
Alanine	365 \pm 5	426 \pm 37	295 \pm 24	373 \pm 39	629 \pm 101	522 \pm 69	363 \pm 21	408 \pm 40
Aspartate	437 \pm 57	584 \pm 93	975 \pm 40	1141 \pm 89	1664 \pm 157	1990 \pm 158	1927 \pm 43	1919 \pm 71
Glutamine	628 \pm 36	684 \pm 34	984 \pm 60	1649 \pm 112†	1314 \pm 202	1850 \pm 323	1496 \pm 60	1381 \pm 90
Glutamate	1971 \pm 201	2576 \pm 198	3327 \pm 188	3572 \pm 236	5696 \pm 574	6185 \pm 516	6487 \pm 206	5541 \pm 890
Glycine	592 \pm 46	756 \pm 94	481 \pm 28	860 \pm 111*	765 \pm 186	695 \pm 87	417 \pm 24	606 \pm 48*
Leucine	39 \pm 3	60 \pm 7*	37 \pm 5	47 \pm 1	76 \pm 34	57 \pm 16	53 \pm 4	44 \pm 5
Serine	548 \pm 40	791 \pm 79*	612 \pm 15	845 \pm 66*	1005 \pm 405	963 \pm 103	521 \pm 51	698 \pm 64
Threonine	463 \pm 45	637 \pm 36*	483 \pm 8	586 \pm 38	597 \pm 55	660 \pm 68	311 \pm 32	370 \pm 30
Valine	49 \pm 6	57 \pm 9	37 \pm 12	47 \pm 1	88 \pm 47	78 \pm 15	58 \pm 5	55 \pm 8
GABA	370 \pm 36	361 \pm 53	373 \pm 38	818 \pm 124*	551 \pm 126	676 \pm 80	536 \pm 27	716 \pm 42*

Values, expressed as nmol/g of brain tissue, are means \pm S.E.M. of four to six experiments.

* P < 0.05, † P < 0.01, statistically significant differences between control and diazepam-treated animals (Student's t -test).

Table 2. Influence of diazepam on specific radioactivities of amino acids in cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum of developing rats after injection of ^{14}C -glucose

	5 days		10 days		14 days		21 days	
	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam
Cerebral cortex								
Aspartate	3.4±0.2	3.3±0.8	6.5±1.5	2.9±0.4	3.2±0.2	5.4±0.4†	4.3±0.8	14.1±1.1‡
Glutamine	0.5±0.1	1.4±0.2†	5.1±0.4	4.6±0.5	6.2±1.2	6.2±0.4	5.7±1.1	14.6±0.6‡
Glutamate	4.8±0.2	5.0±0.6	7.2±0.2	6.3±0.6	6.7±0.4	7.6±0.4	6.1±1.2	5.0±0.5
GABA	5.5±0.4	5.3±1.1	2.9±0.4	0.7±0.7†	3.0±0.5	2.6±0.3	3.5±1.3	18.6±1.6‡
Subcortical areas								
Aspartate	4.2±0.8	3.2±0.2	3.6±0.7	1.3±0.6*	4.6±0.7	6.0±1.7	7.1±1.0	5.2±0.4
Glutamine	1.7±1.2	1.6±0.3	2.5±0.3	0.8±0.3*	8.4±1.3	2.3±0.2‡	6.5±0.5	9.8±1.2
Glutamate	6.4±0.6	4.8±0.7	4.7±0.5	3.6±0.2	5.7±1.0	3.2±0.5*	9.7±0.3	9.7±0.9
GABA	4.5±0.6	3.4±0.5	1.1±0.4	0.5±0.2	2.3±0.3	0.9±0.3*	1.9±0.4	5.9±0.6†
Cerebellum								
Aspartate	1.4±0.9	3.3±0.8	3.8±0.9	3.3±0.8	2.9±1.2	2.5±0.5	4.5±1.4	8.6±0.8*
Glutamine	0.9±0.7	1.3±0.2	3.2±0.6	1.8±0.4	4.8±1.3	3.9±0.4	5.3±1.5	15.3±1.3†
Glutamate	5.6±0.2	5.7±0.6	6.9±1.4	4.0±0.5	5.3±1.3	4.3±0.2	4.8±1.2	11.0±1.4*
GABA	8.6±0.4	9.5±3.8	6.8±0.9	1.2±0.4‡	6.0±3.0	4.0±1.3	5.0±1.8	13.8±0.9†

Values, expressed as dpm/nmol of amino acid, are means±S.E.M. of four to six experiments.

* $P<0.05$, † $P<0.01$, ‡ $P<0.001$, statistically significant differences between control and diazepam-treated animals (Student's *t*-test).

at P21 (Table 1). There was no interaction between age and treatment whatever the amino acid and the structure.

Specific radioactivity of amino acids

As shown in Table 2, after the administration of [^{14}C]glucose, specific radioactivities, expressed as dpm/nmol amino acid, increased in control animals mostly between P5 and P10 for aspartate, glutamine and glutamate in the three cerebral areas studied, whereas that of GABA decreased between the same ages. As shown by the analysis of variance, the effect of age was significant for the four amino acids in the three brain regions ($10^{-4}<P<0.02$). DZP exposure induced 44–82% decreases in specific radioactivities of GABA in cerebral cortex and cerebellum at P10, aspartate and glutamine in subcortical areas at P10 and glutamine, glutamate and GABA in subcortical areas at P14 (Table 2). Conversely, at P21, DZP-induced increases in the specific radioactivities of amino acids were recorded in the three cerebral areas. The analysis of variance showed that the effect of the treatment was significant for aspartate, glutamate and GABA in the cerebral cortex, for glutamate in subcortical areas and for glutamine in cerebellum ($10^{-4}<P<8\times 10^{-3}$). Interaction between age and treatment was recorded for glutamate in the cerebral cortex and aspartate and glutamate in subcortical areas.

After the administration of [^{14}C]βHB, specific radioactivities of the four main cerebral amino acids reached their highest values at P14 in both control and DZP-exposed rats (Table 3). As shown by the two-way analysis of variance, the effect of age was significant for all amino acids in the cerebral cortex, for aspartate and glutamate in subcortical areas and for GABA in the cerebellum ($10^{-4}<P<0.03$). In the cerebral cortex, specific radioactivity of glutamate was significantly increased by 56–64% by DZP at P5 and P10. In subcortical areas, specific radioactivity of glutamate was increased by 176% in P10 DZP-exposed animals over control values. In the cerebellum, DZP treatment increased specific radioactivity of GABA by 33% at P5 and that of aspartate by 50% at P21 (Table 3). The effect of the treatment was significant for aspartate and glutamate in cerebral cortex and for glutamate in subcortical areas ($4\times 10^{-4}<0.02$) (two-way analysis of variance).

DISCUSSION

The results of the present study report the effects of an early chronic exposure to DZP on cerebral metabolic maturation in the rat. However, experiments have been performed about 2.5 hrs after the last injection when measurable concentrations of DZP, comparable to efficient anticonvulsant doses in humans, were still present in plasma. Therefore, the results of the present study do not

Table 3. Influence of diazepam on specific radioactivities of amino acids in cerebral cortex, subcortical areas and cerebellum of developing rats after injection of ^{14}C -b-hydroxybutyrate

	5 days		10 days		14 days		21 days	
	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam	Control	Diazepam
Cerebral cortex								
Aspartate	1.5±0.3	2.7±0.5	3.7±0.2	5.6±0.7	2.8±0.3	2.2±0.6	1.7±0.4	2.1±0.2
Glutamine	1.5±0.2	1.6±0.6	4.7±0.9	5.4±1.2	4.7±0.9	5.0±1.3	4.4±0.7	5.8±0.9
Glutamate	2.8±0.2	4.6±0.7*	4.8±0.2	7.5±0.9*	3.2±0.4	4.0±0.6	2.8±0.3	3.0±0.2
GABA	0.5±0.3	0.3±0.2	1.6±0.6	2.3±0.5	2.3±0.8	3.3±1.5	2.1±0.5	2.5±0.5
Subcortical areas								
Aspartate	4.1±1.2	3.1±0.6	2.6±0.5	5.3±1.5	2.7±0.6	3.2±0.6	1.7±0.5	2.3±0.4
Glutamine	3.4±0.7	1.8±1.0	3.5±1.1	4.7±1.1	4.3±1.0	3.2±1.0	3.3±0.3	4.7±0.8
Glutamate	3.5±0.6	5.0±0.8	3.3±1.1	9.1±0.6†	3.7±0.7	3.4±0.7	2.8±0.5	3.2±0.1
GABA	1.2±0.1	1.2±0.2	2.2±1.1	4.1±1.1	1.8±0.3	2.1±1.2	2.3±0.6	2.5±0.3
Cerebellum								
Aspartate	4.2±1.8	4.1±1.7	3.5±0.6	4.2±0.4	4.5±1.1	2.6±0.7	1.8±0.3	2.7±0.2*
Glutamine	5.7±1.7	3.1±0.5	6.6±1.7	3.1±0.4	6.4±1.5	4.0±1.4	4.1±0.5	4.6±0.5
Glutamate	5.3±1.6	4.4±0.9	6.2±0.9	6.1±0.6	4.6±1.2	3.3±0.8	3.2±0.4	4.5±0.4
GABA	3.6±0.1	4.8±0.3*	2.4±0.8	2.7±0.9	6.1±2.4	2.5±0.6	0.8±0.3	1.1±0.4

Values, expressed as dpm/nmol of amino acid, are means±S.E.M. of four to six experiments.

* $P<0.05$, † $P<0.01$, statistically significant differences between control and diazepam-treated animals (Student's *t*-test).

report the effects of a purely chronic exposure to DZP, but of a mixed chronic and acute exposure that reflects the usual human clinical situation.

Choice of the drug and administration vehicle

Most of the benzodiazepines are insoluble in water and other solvents have to be added in formulations of these drugs for injection. Propylene glycol contained in the commercial preparation of DZP from Roche (Valium injectable) has been shown to have relatively low biological activity and is considered as suitable as a solvent for benzodiazepines^{2,28} especially since it does not affect electrical or chemical seizure thresholds or the pharmacological potency of anticonvulsants.²⁸

Effects of DZP and undernutrition on body and brain weight

Early chronic DZP treatment induced a retardation in body growth ranging from 19 to 21% (Fig. 1). This decrease was similar to the one found in previous studies using the same dose of DZP, 10 mg/kg, or 2.5 mg/kg lorazepam and the same treatment period (P1–P21) as in the present study,^{9,14} 0.5–5 mg/kg clonazepam from P1 to P21 in rats¹⁰ and from P7 to P28 in mice.⁴² These data are also in good agreement with human data showing a decrease in birth weight for gestational age and for birth length in human neonates from mothers using oxazepam (15–60 mg daily) or DZP (5–30 mg daily) alone or in combination.²⁶ The deficit in brain weight induced by postnatal exposure to various benzodiazepines is still recorded 12–14 days after the end of the treatment, i.e. at P30–P35^{9,10,14} and even 40 days after discontinuation of DZP treatment in the present study, with a highly significant 11% decrease in body weight of P60 DZP-exposed rats compared to controls. The 9–26% decrease in brain weight induced by chronic DZP treatment in the present study is also in good accordance with the 14–25% decrease in the weight of various brain regions after 22 days of 0.5 mg/kg clonazepam starting on P7 in mice.⁴² As for body weight, early DZP exposure has long-term consequences on brain weight with a highly significant 7% reduction of brain weight in P60 DZP-treated rats compared to controls.

Conversely to DZP treatment, undernutrition during suckling decreases body weight without affecting brain weight to the same extent as DZP. Indeed, it is well known that brain weight is spared compared to body weight reduction during early undernutrition.⁶

Effects of DZP and undernutrition on circulating concentrations of glucose and ketone bodies

As shown in previous studies, circulating concentrations of both ketone bodies are highest until the end of the second week of suckling followed by a progressive decrease until weaning time, i.e. 21 days.^{22,31,35,36} DZP does not induce any change in circulating ketone body concentrations, except

for a slight transient increase in ACA concentration at P5 whereas an early chronic phenobarbital exposure increases circulating concentrations of ACA and β HB by 27–99% over control values at all ages studied.³⁵ As previously recorded with phenobarbital given daily over the same developmental period,³⁴ an early chronic DZP exposure decreases plasma glucose concentrations over the whole treatment. Conversely to DZP, undernutrition has no effect on plasma glucose concentrations (Fig. 4), whereas it dramatically increases circulating concentrations of both ketone bodies (Fig. 5). This significant increase in blood ketone bodies induced by food restriction has also been recorded in neonates from different animal species.^{11,22,27}

Therefore, the opposite changes in the circulating concentrations of metabolic substrates induced by DZP and undernutrition together with the relative sparing of brain weight compared to body weight confirm that the possible metabolic effects related to the administration of DZP will be direct effects not related to sedation-induced undernutrition. These data allowed us to perform the remaining part of the study only on vehicle- and DZP-exposed rats. Conversely, the increase in circulating concentrations of ketone bodies induced by phenobarbital,³⁵ although not as significant as the one induced by undernutrition may be indicative of a longer sedation time and of effects at least partly related to sedation-induced undernutrition.

Effects of DZP on glucose utilization by the developing brain

In the present work, at the earlier ages, P5 and P10, the amount of radioactivity remaining in brain glucose is significantly higher in DZP- than in vehicle-exposed rats, showing a reduction in the amount of glucose used by the brain. This increase in brain glucose radioactivity is in good accordance with the increase in brain glucose uptake induced by the acute administration of DZP to adult rats.¹⁸ DZP only decreases the efficiency of amino acid biosynthesis from glucose at P5 and P10. These data are in agreement with previous results from our group showing a reduction in glucose incorporation into cerebral amino acids in P7–P10 rats exposed to early chronic phenobarbital treatment.³⁴ Thus, both anticonvulsants delay the overall rate of glucose utilization of the developing rat brain, especially acquisition of the active incorporation of carbon glucose into amino acids¹⁷ which is an index of cerebral maturation. However, from P14, the distribution of radioactivity between cerebral glucose, carboxylic and amino acids is similar in DZP- and vehicle-exposed rats, reflecting either a tolerance to and/or the more active clearance and shorter half-life of the drug with development, as previously shown both for DZP^{20,29,37} (and the present paper) and PhB.³⁴

Effects of DZP on brain amino acid metabolism

Early chronic DZP exposure does not have prominent effects on brain amino acid concentration (Table 1). DZP treatment seems to interfere mainly with the metabolism and biosynthesis of neutral amino acids, since the only marked changes, recorded in the cerebellum at P5 and P10, concern mainly glutamine, glycine, leucine, serine and threonine. Conversely, DZP treatment has no effect on the concentration of most neurotransmitter amino acids, mainly in the cerebral cortex. These results are partly in contradiction with those recorded after chronic perinatal clonazepam treatment (100 μ g/kg) in rats, whose cerebellar amino acid concentration is decreased at P7 by the treatment but, as in the present study, unaffected at P21.²¹

From P5 to P14, specific radioactivities of cerebral amino acids are not affected or decreased by DZP treatment with [U -¹⁴C]glucose as a precursor while they are increased after the injection of [3 -¹⁴C] β HB which is a very efficient precursor of amino acid biosynthesis in the immature brain,^{4,5,31} as previously recorded after a neonatal chronic phenobarbital exposure.³⁴ Moreover, it must be kept in mind that the development of metabolic compartmentation of glutamine and glutamate takes place during the 2nd week of postnatal life^{32,41} and our results may be indicative of an effect of DZP on the maturation of the compartmentation of glutamate metabolism.

Conversely, at P21 in all brain areas and for aspartate at P14 in the cerebral cortex, the specific radioactivities of amino acids are greatly increased in DZP-exposed compared to vehicle-exposed rats after the administration of labeled glucose (Table 2), while they are not affected after BHB injection (Table 3). This marked increase in amino acid biosynthesis from glucose at P21 may be related to the development of tolerance to DZP at the end of the treatment and to the shorter half-life of the benzodiazepine whose concentration greatly decreases in both plasma and brain between

P14 and P21 (Figs 2 and 3). Tolerance to the anticonvulsant effects of benzodiazepines has been well documented.^{13,20} The quite subtle effect of the drug on amino acid metabolism in the developing rat appears clearly in both the present study and the work of Hannah *et al.*,²¹ with no measurable effects of DZP on cerebral amino acid concentration at the end of the 3rd week of treatment.

Comparison with the effects of phenobarbital on cerebral energy metabolism

The results of the present study show that the consequences of early chronic DZP exposure on cerebral amino acid metabolism are quite subtle and mostly manifest at P5 and P10 while phenobarbital reduces the efficiency of glucose as a precursor for amino acid biosynthesis until P14.³⁴ Thus, conversely to phenobarbital, DZP does not seem to interfere with the maturation of this metabolic pathway which essentially develops between P10 and P14.¹⁷ Likewise, DZP induces changes in the specific radioactivities of amino acids (Tables 2 and 3) which are much less pronounced than those induced by early exposure to phenobarbital, whatever the precursor may be, [U-¹⁴C]glucose or [3-¹⁴C]βHB.^{34,35} These data are in good accordance with the generally believed lower toxicity of DZP compared to phenobarbital.

In conclusion, the cerebral metabolic consequences of neonatal exposure to DZP appear to be quite mild and have no durable consequences on brain energy metabolism of the developing rat. They are also independent on sedation-induced undernutrition.

Acknowledgements—This work was supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U 272) and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Toxicologie No. 91C0661). The authors wish to thank the Laboratoires Roche (Basel, Switzerland and Neuilly-sur-Seine, France) for the kind gift of Valium injectable ampoules (10 mg/2 ml). The authors are grateful to Pr. P. Nabet, Chief of the Laboratoire de Biochimie, Hôpital Central, CHRU Nancy, and to Mrs Gelot for their kind help in cerebral amino acid measurements. The assistance of E. Jourdan for amino acid separation and of G. Simon for DZP plasma and brain measurements is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Burdette D. E. (1990) Benzodiazepines. In *Comprehensive Epileptology* (eds Dam M. and Gram L.), pp. 547–561. Raven Press, New York.
- Crankshaw D. P. and Raper C. (1971) The effect of solvents on the potency of chlordiazepoxide, diazepam, medazepam and nitrazepam. *J. Pharm. Pharmac.* **23**, 313–321.
- Cremer J. E. (1982) Substrate utilization and brain development. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2**, 394–407.
- DeVivo D. C., Leckie M. P. and Agrawal H. C. (1973) The differential incorporation of β-hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate of the newborn rat. *Brain Res.* **55**, 485–490.
- DeVivo D. C., Leckie M. P. and Agrawal H. C. (1975) D-β-Hydroxybutyrate: a major precursor of amino acids in developing rat brain. *J. Neurochem.* **25**, 161–170.
- Dobbing J. (1970) Undernutrition and the developing brain. In *Developmental Neurobiology* (ed Himwich W. A.), pp. 241–261. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois.
- Dobbing J. (1974) The later development of the brain and its vulnerability. In *Scientific Foundations of Pediatrics* (eds Davis J. A. and Dobbing J.), pp. 565–577. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Farrel K. (1986) Benzodiazepines in the treatment of children with epilepsy. *Epilepsia* **27**, Suppl. 1, S45–S51.
- File S. E. (1986) Effects of neonatal administration of diazepam and lorazepam on performance of adolescent rats in tests of anxiety, aggressive behavior, learning and convulsions. *Neurobehav. Toxic. Terat.* **8**, 301–306.
- File S. E. (1986) The effects of neonatal administration of lorazepam on passive avoidance and on social, aggressive and exploratory behavior of adolescent male rats. *Neurobehav. Toxic. Terat.* **8**, 447–452.
- Flecknell P. A. and Wootton R. (1989) Cerebral blood flow and metabolism in fasting neonatal piglets. *Biol. Neonate* **55**, 275–280.
- Flexner L. B. (1951/1952) The development of the cerebral cortex: a cytological, functional and biochemical approach. *Harvey Lectures, Series XLVII*, 156–179.
- Frey H. H. (1986) Experimental evidence for the development of tolerance to anticonvulsant drug effects. In *Tolerance to Beneficial and Adverse Effects of Antiepileptic Drugs* (eds Frey H. H., Koella W. P., Froscher W. and Meinardi H.), pp. 7–16. Raven Press, New York.
- Frieder B., Epstein S. and Grimm V. E. (1984) The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups. *Psychopharmacology* **83**, 51–55.
- Frieder B. and Grimm V. E. (1985) Some lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam. *J. Neurochem.* **45**, 37–42.
- Frieder B., Meshorer A. and Grimm V. E. (1984) The effect of exposure to diazepam through the placenta or through the mother's milk. *Neuropharmacology* **23**, 1099–1104.
- Gaitonde M. K. and Richter D. (1966) Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain. *J. Neurochem.* **13**, 1309–1316.
- Gey K. F. (1973) Effect of benzodiazepines on carbohydrate metabolism in rat brain. In *The Benzodiazepines* (eds Garattini S., Mussini E. and Randall L. O.), pp. 243–255. Raven Press, New York.

19. Grimm V. (1984) A review of diazepam and other benzodiazepines in pregnancy. In *Neurobehavioral Teratology* (ed. Yanai J.), pp. 153–162. Elsevier, Amsterdam.
20. Haigh J. R. M. and Feely M. (1988) Tolerance to the anticonvulsant effect of benzodiazepines. *Epilepsia* **9**, 361–366.
21. Hannah R. S., Spira A. W. and Roth S. H. (1989) The effects of two anticonvulsants on amino acid levels in the developing rat cerebellum. *Neurochem. Res.* **14**, 427–429.
22. Hawkins R. A., Williamson D. H. and Krebs H. A. (1971) Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain *in vivo*. *Biochem. J.* **122**, 13–18.
23. Kabra P. M., Stevens G. L. and Marton L. J. (1978) High-pressure liquid chromatographic analysis of diazepam, oxazepam and *N*-desmethyldiazepam in human blood. *J. Chromatogr.* **150**, 355–360.
24. Kaneko S. (1991) Antiepileptic drug therapy and reproductive consequences: functional and morphological effects. *Reprod. Toxic.* **5**, 179–198.
25. Kraus H., Schlenker S. and Schwedesky D. (1974) Developmental changes of cerebral ketone body utilization in human infants. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* **355**, 164–170.
26. Laegreid B. L., Hagberg G. and Lundberg A. (1992) The effects of benzodiazepines on the fetus and the newborn. *Neuropediatrics* **23**, 18–23.
27. Levitsky L. L., Fisher D. E., Paton J. B. and Delannoy C. W. (1977) Fasting plasma levels of glucose, acetoacetate, D- β -hydroxybutyrate, glycerol, and lactate in the baboon infant: correlation with cerebral uptake of substrates and oxygen. *Pediatr. Res.* **11**, 298–302.
28. Löscher W., Nolting B. and Fassbender C. P. (1990) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. I. The influence of administration vehicles. *Epilepsy Res.* **7**, 173–181.
29. Marcucci F., Mussini E., Airoldi L., Guatani A. and Garattini S. (1973) Diazepam metabolism and anticonvulsant activity in newborn animals. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3051–3059.
30. Mellanby J. and Williamson D. H. (1974) Acetoacetate. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4 (eds Bergmeyer H. U. and Gawehn K.), pp. 1840–1843. Academic Press, New York.
31. Nehlig A. and Pereira de Vasconcelos A. (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* **40**, 163–221.
32. Patel A. J. and Balazs R. (1970) Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. *J. Neurochem.* **17**, 955–971.
33. Patel M. S. and Owen O. E. (1977) Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J. Neurochem.* **28**, 109–114.
34. Pereira de Vasconcelos A. and Nehlig A. (1987) Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids. *Dev. Brain Res.* **36**, 219–229.
35. Pereira de Vasconcelos A., Schroeder H. and Nehlig A. (1987) Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. II. Incorporation of β -hydroxybutyrate into amino acids. *Dev. Brain Res.* **36**, 231–236.
36. Ransom B. R. and Elmore J. G. (1991) Effects of antiepileptic drugs on the developing central nervous system. In *Advances in Neurology*, Vol. 55 (eds Smith D., Treiman D. and Trimble M.), pp. 225–237. Raven Press, New York.
37. Schmutz M., David J., Grewal R. S., Bernasconi R. and Baltzer V. (1986) Pharmacological and neurochemical aspects of tolerance. In *Tolerance to Beneficial and Adverse Effects of Antiepileptic Drugs* (eds Frey H. H., Koella W. P., Froscher W. and Meinardi H.), pp. 25–36. Raven Press, New York.
38. Schroeder H., Bomont L. and Nehlig A. (1991) Influence of early chronic phenobarbital treatment on cerebral arteriovenous differences of glucose and ketone bodies in the developing rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* **9**, 453–461.
39. Tucker J. C. (1985) Benzodiazepines and the developing rat: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**, 101–111.
40. Van den Berg C. J. (1970) Compartmentation of glutamate metabolism in the developing brain: experiments with labelled glucose, acetate, phenylalanine, tyrosine and proline. *J. Neurochem.* **17**, 973–983.
41. Vree T. B., Baars A. M., Hekster Y. A. and Van der Kleijn E. (1979) Simultaneous determination of diazepam and its metabolites *N*-desmethyldiazepam, oxydiazepam and oxazepam on plasma and urine of man and dog by means of high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **162**, 605–615.
42. Wang L. I. and Huang Z. (1990) Effect of clonazepam on brain development of mice. *Dev. Pharmacol. Ther.* **15**, 21–25.
43. Williamson D. H. and Mellanby J. (1974) D-(-)-3-Hydroxybutyrate. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Vol. 4 (eds Bergmeyer H. U. and Gawehn K.), pp. 1836–1839. Academic Press, New York.
44. Yeh Y. Y., Streuli V. L. and Zee P. (1977) Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. *Lipids* **12**, 957–964.

5. DIAZEPAM ET UTILISATION CEREBRALE LOCALE DE GLUCOSE

5.1. Théorie de la méthode d'autoradiographie quantitative au 2-désoxyglucose

La mise au point de la méthode d'autoradiographie quantitative au 2DG-(^{14}C) par Sokoloff et coll. (1977b) permet de mesurer les variations des niveaux d'activité métabolique et fonctionnelle de l'ensemble des territoires cérébraux d'un animal conscient dans des conditions physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques.

Cette méthode repose sur le fait que le glucose est le seul substrat du métabolisme énergétique cérébral dans les conditions normales chez l'homme ou l'animal adulte. Toute modification du métabolisme énergétique se traduira par une modification de l'utilisation du glucose et réciproquement. En raison du lien qui existe entre l'activité fonctionnelle cérébrale et le métabolisme énergétique, cette méthode permet d'identifier toutes les aires cérébrales dont l'activité fonctionnelle est modifiée dans des conditions physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques (Sokoloff, 1982).

5.1.1. Choix du 2DG-(^{14}C)

Le glucose marqué au ^{14}C ne peut pas être utilisé car il est converti trop rapidement en CO_2 , qui est lui-même libéré du tissu cérébral trop rapidement (Sacks, 1957). Ces limitations pour le glucose - ^{14}C sont évitées par l'utilisation du 2DG-(^{14}C).

5.1.2. Propriétés biochimiques du 2DG dans le cerveau

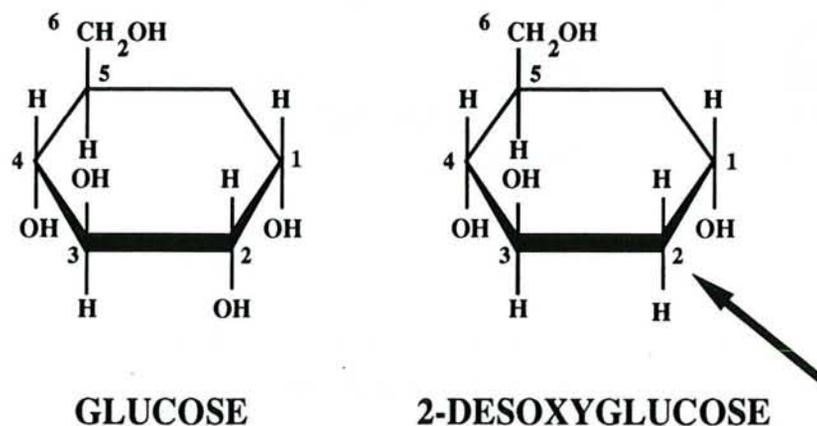


figure 14. Structure chimique du glucose et du 2-désoxyglucose

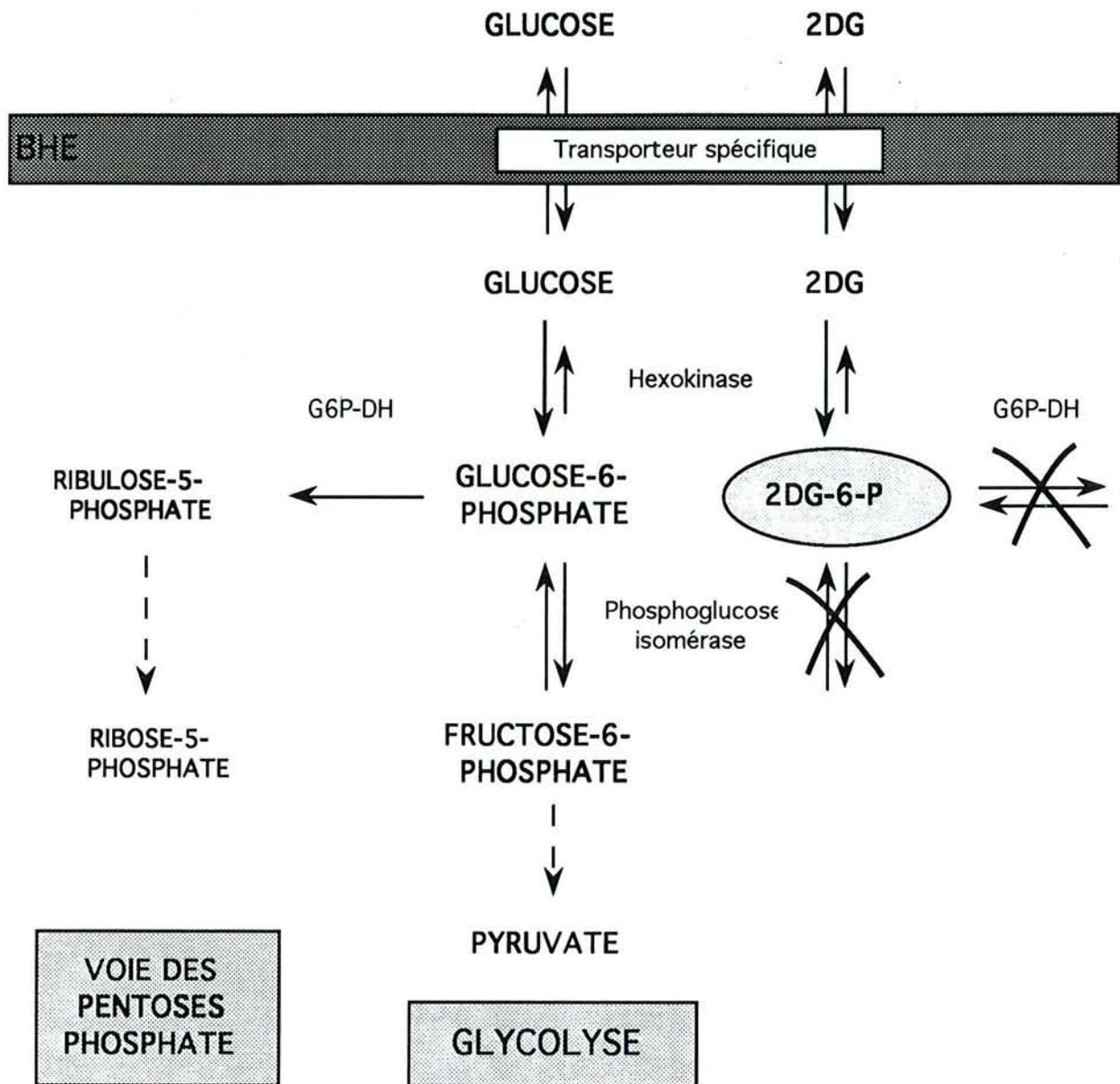


figure 15. Devenir du glucose et du 2DG dans le tissu cérébral
(d'après Stryer, 1988 et Sokoloff, 1977).

Le 2DG est un analogue structural du glucose. Il n'en diffère que par le remplacement d'un groupement hydroxyl en position 2 par un atome d'hydrogène (*figure 14*).

De ce fait, son métabolisme est identique à celui du glucose jusqu'au moment où il atteint une étape de la glycolyse où sa structure empêche son métabolisme ultérieur. Ainsi, le 2DG est transporté entre sang et cerveau par le même système de transport saturable et stéréospécifique que le glucose. Dans le tissu cérébral, il entre en compétition avec le glucose pour l'hexokinase qui phosphoryle les deux substrats pour former le glucose-6-phosphate (G6P) et le 2-désoxyglucose-6-phosphate (2DG6P). C'est ensuite que le métabolisme de ces deux molécules diffère.

Le G6P est converti en fructose-6-phosphate par la phosphohexose-isomérase, puis est métabolisé par la voie de la glycolyse et du cycle des acides tricarboxyliques. Par contre, le 2DG6P ne peut pas être converti en fructose-6-phosphate en raison de l'absence du groupement hydroxyl sur le second atome de carbone. De plus, le 2DG6P n'est pas un bon substrat pour la G6P-déshydrogénase, enzyme responsable de l'entrée du G6P dans le cycle des pentoses-phosphate qui transforme le G6P en ribose-5-phosphate (*figure 15*). Il ne peut pas être non plus reconverti en 2DG sous l'action de l'hexokinase, l'activité de cette enzyme étant très faible dans le cerveau des mammifères (Stryer, 1988).

Dans ces conditions, le 2DG-^(14C), une fois métabolisé en 2DG6P-^(14C), est piégé dans le tissu cérébral. La vitesse de formation du 2DG6P dans une région du SNC est donc le reflet du métabolisme énergétique cérébral dans cette région, ou plus exactement, de l'UCLG.

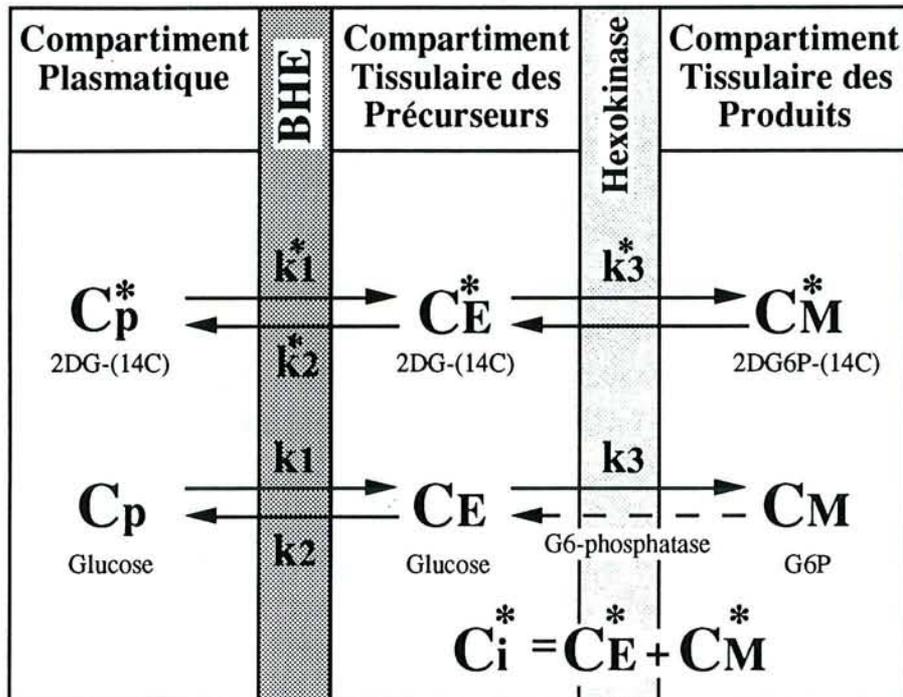


figure 16. Représentation schématique du modèle théorique de la méthode au 2DG

C_p et C_p^* représentent les concentrations plasmatiques et C_E , C_E^* , les concentrations tissulaires respectivement du glucose et du 2DG-(^{14}C). C_M et C_M^* sont les concentrations tissulaires respectivement du G6P et du 2DG6P-(^{14}C). C_i^* est la concentration tissulaire totale de ^{14}C . k_1 , k_2 , k_3 , k_1^* , k_2^* et k_3^* sont les constantes des réactions de transport à travers la barrière hémato-encéphalique et de phosphorylation par l'hexokinase.

5.1.3. Description du modèle théorique

La connaissance des propriétés biochimiques du glucose et du 2DG permettent de construire un modèle à trois compartiments (*figure 16*) : le compartiment plasmatique, le compartiment tissulaire des précurseurs (glucose et 2DG) et le compartiment tissulaire des produits de réaction (G6P et 2DG6P).

Le glucose et le 2DG-(¹⁴C) présents dans le plasma entrent en compétition pour le même transporteur membranaire au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Puis ils pénètrent dans le même pool de précurseur dans lequel ils entrent à nouveau en compétition soit pour le transporteur de sortie, soit pour l'hexokinase qui les phosphoryle respectivement en G6P et en 2DG6P-(¹⁴C).

La réaction de l'hexokinase est irréversible et le 2DG6P-(¹⁴C), qui n'est pas un substrat adéquat pour d'autres enzymes, s'accumule dans le tissu alors que le G6P est métabolisé en CO₂ et H₂O.

Le modèle tient également compte du fait qu'une partie du G6P peut être hydrolysée en glucose par la glucose-6-phosphatase.

Cependant, l'application de ce modèle à la quantification de l'utilisation cérébrale locale de glucose dépend de la validité de plusieurs hypothèses :

- le 2DG-(¹⁴C) et le 2DG6P-(¹⁴C) doivent être présents à l'état de traces : c'est-à-dire que leurs concentrations dans le sang et les tissus doivent être quantitativement négligeables et pharmacologiquement inactives.

- le métabolisme glucidique du cerveau doit être stable : c'est-à-dire que la concentration de glucose plasmatique, le taux d'utilisation locale de glucose par le cerveau et les concentrations des intermédiaires glycolytiques doivent rester constants durant toute la période de mesure.

5.1.4. Equation opérationnelle de la méthode

L'équation opérationnelle de la méthode pose que si le 2DG-(¹⁴C) est introduit dans le sang au temps 0 et circule pendant un temps T , le taux R_i de consommation de glucose dans tout tissu cérébral i peut être calculé, pourvu que la concentration totale de ¹⁴C dans le tissu $C_i^*(T)$ soit mesurée au temps T .

$$R_i = \frac{\text{Quantité totale de produit marqué formé pendant l'intervalle de temps de 0 à T}}{\left[\frac{\lambda \cdot V_m^* \cdot K_m}{\phi \cdot V_m \cdot K_m^*} \right] \cdot \left[\int_0^T \frac{C_p^*}{C_p} dT - e^{-(k_2^*+k_3)T} \cdot \int_0^T \frac{C_p^*}{C_p} e^{(k_2^*+k_3)T} dT \right]}$$

$\overbrace{C_i^*(T) - k_1^* e^{-(k_2^*+k_3)T} \cdot \int_0^T C_p^* \cdot e^{-(k_2^*+k_3)T} dT}$
¹⁴C total dans le tissu au temps T ¹⁴C restant dans le précurseur présent dans le tissu au temps T

facteur de correction pour effet isotopique activité spécifique plasmatique intégrée correction pour le délai d'équilibration entre le tissu et le plasma Activité spécifique intégrée du précurseur dans le tissu

a) le numérateur de l'équation

Il représente la quantité de produit radioactif formé au temps T . Elle est égale à $C_i^*(T)$ (concentration tissulaire en ¹⁴C dans le tissu i au temps T , mesurée par autoradiographie quantitative) moins la concentration de 2DG-(¹⁴C) libre non métabolisé encore présent dans le tissu. Cette dernière est calculée à partir de l'évolution de la concentration de 2DG-(¹⁴C) dans le plasma artériel et des constantes cinétiques appropriées.

b) le dénominateur de l'équation

Il représente l'activité spécifique intégrée du pool de précurseur multipliée par le facteur de correction pour effet isotopique appelé aussi "constante mixte". Le terme avec le facteur exponentiel au dénominateur tient compte du délai d'équilibration entre le pool de précurseur dans le tissu et le plasma dans lequel l'activité spécifique est mesurée directement.

L'activité spécifique du pool de précurseur dans le plasma est calculée en fonction des concentrations de glucose et de 2DG-(¹⁴C) mesurées dans le plasma au cours de l'expérimentation.

c) les constantes cinétiques

- k_1, k_1^* et k_2, k_2^* sont les constantes cinétiques pour le transport, respectivement, du glucose et du 2DG-(^{14}C) entre le sang et le cerveau.

- k_3, k_3^* sont les constantes cinétiques de phosphorylation du glucose et du 2DG-(^{14}C) par l'hexokinase.

Ces constantes ont été déterminées expérimentalement chez le rat adulte dans des conditions physiologiques pour la matière blanche et la matière grise (Sokoloff et coll., 1977b). Ces valeurs déterminées chez l'animal adulte ont été conservées pour le calcul de l'UCLG chez le rat immature, comme l'ont décrit Nehlig et coll. (1988). En effet, même si les valeurs obtenues chez le rat adulte ne correspondent pas exactement à celles de l'animal immature, l'importance de l'erreur introduite par l'utilisation de ces données sera minimisée par le fait que tous les termes de l'équation dans lesquels ces constantes cinétiques apparaissent, atteignent des valeurs proches de zéro après 45 minutes d'expérimentation.

d) le facteur de correction pour effet isotopique ou "constante mixte"

Il corrige les différences dans le comportement cinétique du 2DG-(^{14}C) et du glucose avec l'hexokinase. Il est la combinaison de 4 constantes :

- ϕ , une constante entre 0 et 1 qui reflète l'activité de la glucose-6-phosphatase. Ce facteur représente la fraction de glucose qui, une fois phosphorylée, est ensuite métabolisée au travers de la voie de la glycolyse et du shunt des pentoses phosphates (Sokoloff et coll., 1977b). En l'absence d'une déphosphorylation significative du G6P du fait de la faible activité de la glucose-6-phosphatase dans le cerveau de mammifères (Hers, 1957 ; McIlwain, 1985) au cours de la période expérimentale de 45 minutes, ϕ est égale à 1 (Mori et coll., 1990 ; Sokoloff et coll., 1977b).

- λ est le rapport des volumes de distribution pour le 2DG-(^{14}C) et le glucose dans le tissu cérébral. Comme ces deux volumes varient de la même façon dans les différents territoires, λ est constant dans l'ensemble du cerveau.

λ dépend des équilibres entre la libération et le transport du 2DG-(^{14}C) et du glucose du sang vers le cerveau et leur phosphorylation dans les tissus. Ce terme peut donc varier si les conditions expérimentales font que l'un de ces équilibres est altéré (Crane et coll., 1981 ; Gjedde, 1982 ; Pardridge et coll., 1982). Les mesures biochimiques de λ dans le cerveau de rat ont confirmé que ce facteur augmentait dans des conditions d'hypoglycémie et diminuait en hyperglycémie (Mori et coll., 1989) avec pour conséquence des modifications de la valeur de la constante mixte (Schuier et coll., 1981, 1990 ; Suda et coll., 1981, 1990).

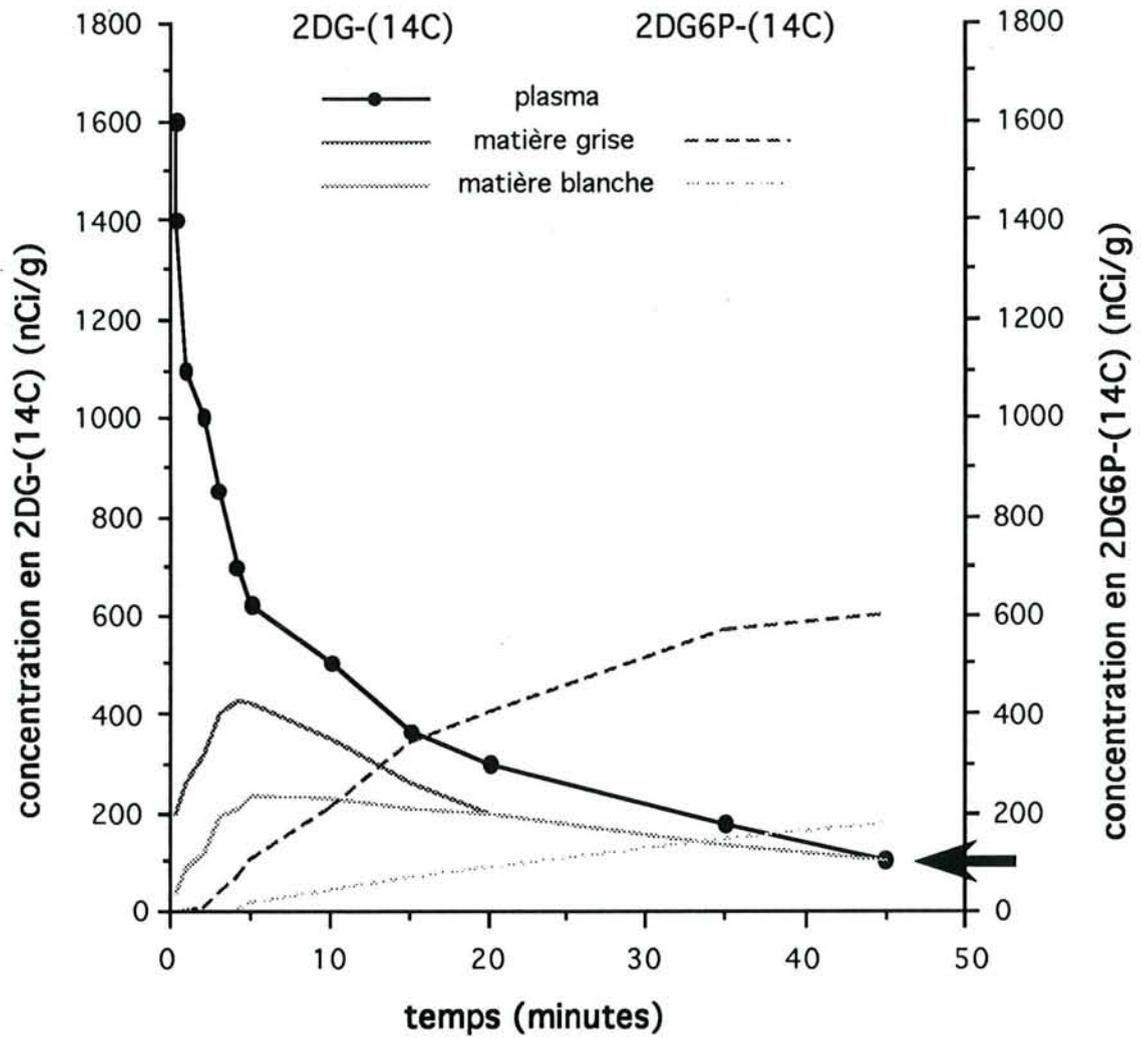


figure 17. Représentation graphique de l'évolution des concentrations de 2DG-(^{14}C) dans le plasma, la matière grise et la matière blanche ainsi que de l'évolution des concentrations de 2DG6P-(^{14}C) dans la matière grise et la matière blanche, au cours de la période expérimentale de 45 minutes chez le rat adulte (d'après Sokoloff et coll., 1977).

- V_m^*/V_m est le rapport des vitesses maximales de phosphorylation du 2DG-(^{14}C) et du glucose par l'hexokinase. Ces deux vitesses maximales varient proportionnellement d'un tissu cérébral à l'autre. Le rapport V_m^*/V_m reste donc constant dans tout le cerveau.

- Il en est de même pour K_m/K_m^* qui est le rapport des constantes de Michaelis-Menten et qui représente les propriétés cinétiques de l'enzyme.

La constante mixte varie d'une structure cérébrale à l'autre mais dans des proportions très faibles. On peut donc considérer qu'elle est la même pour l'ensemble des territoires cérébraux.

5.1.5. Considérations théoriques pour la mise en place de la méthode

Pour mesurer R_i , le taux d'utilisation cérébrale locale de glucose, il faut déterminer pour chaque animal et à chaque expérimentation les variables suivantes :

- l'évolution de la concentration artérielle plasmatique de 2DG-(^{14}C), C_p^* , du temps zéro jusqu'au moment du sacrifice de l'animal.
- la concentration artérielle plasmatique de glucose C_p au cours de la même période
- la concentration locale de ^{14}C dans le tissu au moment du sacrifice de l'animal $C_i^*(T)$

Pour déterminer la consommation tissulaire de glucose, il est nécessaire de connaître la concentration tissulaire de 2DG6P-(^{14}C) par rapport à la concentration tissulaire totale de ^{14}C . Pour cela, il est indispensable de connaître les valeurs des constantes cinétiques. Comme il n'est pas possible de les mesurer pour chaque animal, il a été choisi d'administrer le 2DG-(^{14}C) en bolus intraveineux au temps zéro et d'attendre au moins 45 minutes pour sacrifier l'animal de façon que :

- la clairance plasmatique du 2DG-(^{14}C) soit importante
- les concentrations de 2DG6P-(^{14}C) dans les tissus représentent la plus grande partie du ^{14}C mesurée par autoradiographie.

La *figure 17* représente l'évolution des concentrations plasmatiques et cérébrales de 2DG-(^{14}C) et de 2DG6P-(^{14}C) chez le rat adulte au cours des 45 minutes d'expérimentation.

Alors que la concentration plasmatique de 2DG-(^{14}C) baisse après le pic suivant l'injection, les concentrations tissulaires de 2DG-(^{14}C) libres augmentent, le tissu prélevant très rapidement le 2DG-(^{14}C). Puis, elles diminuent du fait de la conversion continue du 2DG-(^{14}C) en 2DG6P-(^{14}C). Après 45 minutes, les concentrations tissulaires et plasmatiques de 2DG-(^{14}C) ont atteint des niveaux très bas et le 2DG6P-(^{14}C) présent dans les tissus représente la plus grande partie du ^{14}C mesuré. Le numérateur de l'équation opérationnelle représente donc la concentration tissulaire finale du ^{14}C mesurée par autoradiographie à

laquelle on soustrait la concentration tissulaire en 2DG-(¹⁴C) libre correspondant au point final des courbes indiqué par une flèche sur la *figure 17*. Le numérateur de l'équation est donc égal à la concentration finale en 2DG6P-(¹⁴C) dans le tissu cérébral.

5.1.6. Conclusion

En raison de la relation entre l'activité fonctionnelle locale et le métabolisme énergétique, la méthode au 2DG-(¹⁴C) permet d'identifier toutes les structures cérébrales dont l'activité fonctionnelle est augmentée ou diminuée dans des conditions physiologiques, pathologiques ou pharmacologiques (Sokoloff, 1981, 1986).

Cette méthode permet de visualiser simultanément l'activité fonctionnelle dans l'ensemble du cerveau et d'identifier ainsi les voies nerveuses qui sont affectées par un agent pharmacologique. Ainsi, la méthode au 2DG-(¹⁴C) permet de détecter une modification de l'utilisation de glucose non seulement au niveau du site d'action primaire de l'agent pharmacologique, mais aussi au niveau d'autres structures de la même voie nerveuse où la variation de l'activité fonctionnelle n'est qu'une conséquence de l'action de la drogue au niveau primaire.

5.2. Effets des anticonvulsivants sur l'activité fonctionnelle cérébrale

A ce jour, les conséquences d'un traitement aigu ou chronique au DZ n'ont été étudiées que chez l'animal adulte. Ainsi, différents travaux ont montré que l'administration aiguë de DZ induit une diminution de l'UCLG quelle que soit la dose utilisée (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Nakamura et coll., 1993 ; Nehlig et coll., 1987).

L'utilisation de doses relativement faibles (0,1 à 1,0 mg/kg) a permis de mettre en évidence une réponse métabolique du type tout ou rien à l'administration de DZ (Kelly et coll., 1986). En effet, l'injection de 0,1 mg/kg de DZ n'induit aucune modification significative de l'UCLG dans l'ensemble des 61 régions étudiées alors que l'administration de doses de 0,3 et 1,0 mg/kg provoque un abaissement identique des taux d'utilisation de glucose (20 à 40 %) dans les mêmes structures. Avec des doses plus élevées (1,0 et 2,5 mg/kg), le DZ induit une réduction significative des taux de métabolisme cérébral dont l'amplitude augmente avec la dose administrée (Ableitner et coll., 1985). Ainsi, l'UCLG est significativement diminuée de 19 et 27 % dans les corps mammillaires et de 18-26 et 25-37 % dans les différents noyaux thalamiques aux doses respectives de 1,0 et 2,5 mg/kg.

Par ailleurs, les effets déprimeurs du DZ sur le métabolisme énergétique cérébral sont bien corrélés à la liaison du DZ avec les récepteurs aux BZD. En effet, l'administration de Ro 15-1788, un antagoniste des récepteurs aux BZD, chez des animaux prétraités avec du DZ supprime la diminution de l'UCLG qui est provoquée par cette drogue (Ableitner et col., 1985).

Les structures cérébrales les plus sensibles à l'administration aiguë de DZ sont les corps genouillés, l'hippocampe, le thalamus, les corps mammillaires et différentes structures sensorielles alors que l'amygdale est la région dont le métabolisme est le moins affecté (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Nehlig et coll., 1987).

L'administration chronique ou subchronique de DZ chez le rat adulte induit également une dépression de l'activité fonctionnelle cérébrale mais dans un nombre plus limité de structures et dans des régions différentes par rapport à un traitement aigu (Ableitner et coll., 1985 ; Laurie et Pratt, 1989), mettant en évidence le développement d'une tolérance au traitement.

D'autre part, les résultats obtenus dans ce type d'étude permettent d'obtenir des informations sur le rôle que peuvent avoir certaines structures cérébrales dans les différents effets pharmacologiques du DZ. Ainsi, les corps mammillaires qui sont une des régions les plus sensibles à l'administration aiguë de DZ ne sont plus affectés après 3 semaines à la dose de 5 mg/kg/jour (Laurie et Pratt, 1989). Or, il a été montré que la tolérance aux effets anxiolytiques du DZ n'apparaît chez le rat qu'après trois semaines de traitement (File et coll., 1987 ; Vellucci et File, 1979), ce qui correspond au moment où l'UCLG mesurée dans les corps mammillaires chez les rats traités au DZ redevient identique à celle observée chez les témoins. Ces résultats confirment donc ceux obtenus dans les études de comportement quant au rôle des corps mammillaires dans l'anxiété et dans l'action anxiolytique des BZD (Kataoka et coll., 1982, 1987).

Cependant, à ce jour, aucune étude n'a mesuré les conséquences d'une exposition chronique précoce au DZ sur l'activité fonctionnelle cérébrale chez l'animal immature. De même, peu d'informations sont disponibles sur la manière dont certaines structures cérébrales peuvent être préférentiellement affectées par les BZD au cours de la maturation postnatale. En revanche, les effets du même type de traitement mais avec une autre molécule anticonvulsivante, le PhB, sur l'évolution postnatale de l'utilisation cérébrale de glucose ont fait l'objet d'études dans notre laboratoire (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a).

Il apparaît ainsi qu'un traitement chronique au PhB à dose anticonvulsivante du 2^e au 35^e jour de vie postnatale induit une réduction massive du taux d'utilisation de glucose (35 à 45 %) dans la plupart des 58 structures étudiées au cours de la période de traitement à l'exception du stade de 17 jours où seules 10 structures présentent une réduction significative de l'UCLG. Chez l'animal adulte, soit 35 à 45 jours après l'arrêt du traitement, l'UCLG mesurée chez les rats exposés au PhB reste significativement abaissée par rapport aux valeurs témoins dans 26 des 58 structures, ces diminutions étant réparties dans l'ensemble des systèmes étudiés. Les effets du PhB sur l'activité fonctionnelle cérébrale s'accompagnent, comme dans le cas du DZ, d'une réduction des poids corporel et cérébral et d'une diminution du taux de synthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose (Pereira de Vasconcelos

et Nehlig, 1987) mais qui est compensée par une utilisation accrue du BHB (Pereira de Vasconcelos et coll., 1987).

Alors que ces 2 drogues induisent des perturbations du métabolisme énergétique cérébral à des stades très précoces du développement cérébral, il est apparu intéressant d'étudier quelles pouvaient être les structures cérébrales les plus vulnérables à une exposition postnatale au DZ, en comparaison avec les résultats obtenus avec le PhB.

"Short- and long-term effects of neonatal diazepam exposure on local cerebral glucose utilization in the rat."

H. Schroeder, A. Nolte, S. Boyet, V. Koziel, A. Nehlig

Brain Research, 1994 (sous presse)

La mesure de l'UCLG par la technique d'autoradiographie quantitative au 2DG-(¹⁴C) mis au point chez le rat adulte par Sokoloff et coll. (1977b) et adaptée à l'animal immature par Nehlig et coll. (1988) est l'une des méthodes les plus représentatives de l'évaluation de l'activité fonctionnelle cérébrale. Cette technique permet de mesurer simultanément l'utilisation de glucose dans l'ensemble des aires cérébrales d'un animal conscient et d'étudier les variations de l'activité fonctionnelle des différents territoires cérébraux dans des conditions physiologiques, pharmacologiques ou pathologiques. Cette méthode a été ainsi appliquée à l'étude de pathologies comme les convulsions (Pereira de Vasconcelos et coll., 1992) ou l'hypoxie (Bômont et coll., 1992) ainsi qu'à des modèles pharmacologiques étudiant les effets de médicaments couramment utilisés en pédiatrie comme les anticonvulsivants (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a).

Alors qu'une première étude a mis en évidence des retards de croissance corporelle et cérébrale ainsi que des perturbations de la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose chez des animaux subissant un traitement chronique précoce au DZ (Schroeder et coll., 1994a), il paraissait intéressant d'étudier les conséquences à court et à long terme d'un tel traitement sur l'UCLG et de voir quels pourraient être les territoires cérébraux préférentiellement affectés par le DZ au cours de la maturation postnatale.

L'expérimentation au 2DG-(¹⁴C) a été réalisée chez des rats traités avec le véhicule ou le DZ aux âges de 10, 14, 21 et 60 jours après la naissance. L'UCLG a également été mesurée aux mêmes stades dans un troisième groupe d'animaux qui a été traité dans les mêmes conditions avec du sérum physiologique pour pouvoir déterminer un effet possible du véhicule sur les taux de métabolisme cérébral.

La veille de l'expérimentation, une veine et une artère fémorale ont été cathétérisées sous anesthésie volatile à l'halothane. Après la chirurgie, les animaux ont été replacés dans leur environnement habituel jusqu'au lendemain.

Le jour de l'expérimentation, le 2DG-(¹⁴C) a été injecté par voie intraveineuse à la dose de 4,625 MBq/kg sur un intervalle de temps de 15 à 20 secondes 2 h 30 après la dernière administration de véhicule, DZ ou NaCl. En fonction du stade étudié, 10 à 20 échantillons de sang artériel ont été prélevés au cours de l'expérimentation pour permettre le dosage des concentrations circulantes de glucose et de 2DG-(¹⁴C). De même, les variables physiologiques comme les gaz du sang, la pression artérielle et l'hématocrite ont été régulièrement contrôlées au cours de l'expérience. Quarante-cinq minutes après l'injection du traceur radioactif, les animaux ont été sacrifiés par décapitation. Les cerveaux ont été rapidement prélevés, inclus dans du méthylbutane refroidi à - 25°C, enrobés dans de la carboxyméthylcellulose à 4 % et stockés à - 80°C.

Les cerveaux ont été sectionnés en coupes transversales sériées de 20 µm dans un cryostat à - 22°C. Les coupes ont été immédiatement prélevées sur des lamelles de verre deshydratées sur une platine chauffante à 60°C, numérotées et mises en contact avec des

films pour autoradiographie en même temps que des standards de méthylméthacrylate-(^{14}C) calibrés par rapport à des coupes cérébrales dont la teneur en ^{14}C est connue selon la méthode décrite par Sokoloff et coll. (1977b). L'analyse des autoradiogrammes a été réalisée en densitométrie quantitative à l'aide d'un système d'analyse d'images ou d'un microdensitomètre manuel.

Les valeurs d'UCLG ont été mesurées dans 66 structures cérébrales issues de 12 groupes de 5 à 7 animaux, 4 groupes traités avec le véhicule, 4 avec le DZ et 4 avec du NaCl. A chaque stade, les valeurs des animaux traités avec le DZ ou le NaCl ont été comparées à celles obtenues chez les témoins véhicule au moyen d'un *t*-test de Dunnett.

L'administration de DZ induit une diminution significative du poids corporel à tous les âges étudiés par rapport au véhicule alors qu'aucune modification du poids n'a été mise en évidence entre les animaux traités au NaCl et les témoins recevant le véhicule.

Par ailleurs, aucune modification notable de l'ensemble des variables physiologiques mesurées au cours de l'expérimentation n'a été observée dans les différents groupes d'animaux.

Le DZ induit une diminution de l'utilisation cérébrale moyenne de glucose (UCMG) par rapport au véhicule à tous les stades étudiés. A 14 jours de vie postnatale, cette diminution atteint 34 % et reflète la baisse significative des taux d'utilisation de glucose enregistrée dans 48 des 66 structures cérébrales étudiées. Chez les animaux âgés de 21 jours, la diminution de l'UCMG induite par le DZ n'est plus que de 18 %, reflétant la réduction de plus de la moitié du nombre de structures dont le taux de métabolisme est abaissé par rapport à celui observé au stade précédent. A l'âge adulte, soit 39 jours après l'arrêt du traitement, l'UCMG mesurée chez les rats traités au DZ reste abaissée de 12 % par rapport à la valeur des témoins véhicule mais cette diminution n'est pas significative.

Une exposition chronique précoce au DZ induit par rapport au véhicule une diminution de l'UCLG dans l'ensemble des structures à tous les stades étudiés. A 10 jours, cette diminution varie de 31 à 44 % et est significative dans 13 régions telles que les corps mammillaires, différentes structures limbiques et certaines aires sensorielles comme le cortex olfactif ou les collicules supérieure et inférieure. A 14 jours postnatals, le DZ induit une baisse significative de l'utilisation de glucose de 30 à 53 % dans 48 structures cérébrales appartenant à l'ensemble des systèmes étudiés. A 21 et 60 jours, le nombre de structures dont les taux d'UCLG sont significativement abaissés par le DZ n'est plus que de 23 et 14 respectivement. Il s'agit essentiellement de structures sensorielles comme les cortex auditif, olfactif et visuel, les corps genouillés et le noyau vestibulaire, de différentes régions corticales limbiques et motrices, du septum, de la couche CA₁ de l'hippocampe et des corps mammillaires.

Comparativement à l'administration de sérum physiologique, le véhicule de la préparation injectable de DZ ne provoque aucune modification significative de l'UCMG à aucun des stades étudiés.

À 10 jours de vie postnatale, l'UCLG mesurée chez les animaux traités avec le véhicule n'est différente de celle observée chez les témoins NaCl dans aucune structure cérébrale. Par contre, à 14 et 60 jours, le véhicule induit une hausse significative de l'utilisation de glucose dans respectivement, 9 et 11 aires cérébrales alors qu'à 21 jours, elle provoque une réduction significative des taux de métabolisme énergétique dans 5 régions du cerveau. Ces modifications de l'UCLG sont plus particulièrement localisées dans certaines aires auditives et motrices comme le noyau cochléaire, les corps genouillés, l'aire tegmentale dorsale, le globus pallidus et dans les 3 structures de matière blanche, la capsule interne, la matière blanche du cervelet et le genou du corps calleux.

En conclusion, le métabolisme énergétique cérébral semble le plus sensible à une exposition chronique au DZ uniquement aux stades les plus immatures du développement, c'est-à-dire jusqu'à 14 jours après la naissance confirmant les résultats obtenus dans l'étude des effets du DZ sur la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose (Schroeder et coll., 1994a). Le DZ induit ainsi des diminutions des taux d'utilisation de glucose essentiellement dans des structures postérieures qui sont matures très tôt et qui montrent un niveau basal de métabolisme plus élevé que dans les autres territoires cérébraux (Nehlig et coll., 1988). D'autre part, la réduction du nombre de structures présentant une baisse des taux d'UCLG entre 14 et 21 jours pourrait être le reflet du développement d'une tolérance au DZ ou de la diminution des demi-vies plasmatiques et cérébrales du DZ entre ces 2 stades (cf. chapitre 2).

À long terme, l'administration de DZ au cours des premières semaines de vie postnatale induit une diminution des taux de métabolisme dans des structures riches en récepteurs aux BZD et impliquées dans la vision, l'olfaction, l'audition, la motricité ainsi que dans la mémorisation, l'anxiété et l'émotion. Par contre, l'amygdale, dont le rôle dans l'anxiété et l'émotion reste discuté, est la seule région du cerveau ne présentant aucune sensibilité à l'administration de DZ quelque soit l'âge étudié, bien que ce soit une structure riche en récepteurs aux BZD et ce, dès la naissance (Daval et coll., 1991).

Le véhicule par lui-même ne semble pas affecter de manière significative l'évolution des taux d'UCLG au cours du développement. Par contre, à 60 jours, il semble être partiellement responsable de la dépression induite par le DZ dans quelques régions cérébrales telles que les corps genouillés, certaines aires corticales et les corps mammillaires et exerce un effet dépresseur qui lui est propre au niveau des structures de matière blanche.

**SHORT- AND LONG-TERM EFFECTS OF NEONATAL DIAZEPAM
EXPOSURE ON LOCAL CEREBRAL GLUCOSE UTILIZATION IN THE RAT**

Henri SCHROEDER*, Alexis NOLTE, Sylvette BOYET, Violette KOZIEL and Astrid
NEHLIG

Running title: Diazepam and glucose utilization in immature brain

* to whom all correspondence should be addressed

Address for correspondence:

INSERM U 272

Université de Nancy I

30 rue Lionnois

B.P. 3069

54013 NANCY-CEDEX

FRANCE

Phone: (33) 83.37.35.59

Fax: (33) 83.32.43.40

SUMMARY

The short- and long-term consequences of a neonatal exposure to diazepam (DZP) on the postnatal changes in local cerebral metabolic rates for glucose (LCMRglcs) were studied by the quantitative autoradiographic [^{14}C]2-deoxyglucose method in a total number of 66 brain structures of freely moving rats. Rat pups received a daily subcutaneous injection of 10 mg/kg DZP, of the dissolution vehicle or of saline from postnatal day 2 (P2) to 21 (P21). The animals were studied at 4 ages, P10, P14, P21 and P60. DZP induced a decrease in LCMRglcs which was restricted to 13 areas at P10, mainly sensory and limbic regions. At P14, the treatment had significant metabolic effects on 48 structures belonging to all functional systems. By P21, 23 brain areas were still affected by the treatment, mainly sensory, limbic and motor areas. At P60, i.e. at about 40 days after the end of drug exposure, LCMRglcs still decreased in 14 brain regions which were mainly sensory and limbic structures. The structures most sensitive to both short- and long-term consequences of the anticonvulsant treatment are mammillary body, limbic cortices and sensory regions. The dissolution vehicle increased LCMRglcs in a few brain regions at P14 and P60, whereas it decreased metabolic levels in 5 brain regions at P21. The results of the present study show that the brain appears to be particularly vulnerable to the treatment at P14, period of active brain growth, whereas by P21, the drug is more actively metabolized and a tolerance to the treatment may occur. The long-term effects of the treatment are in good accordance with the well-known effects of DZP on anxiety, sedation and memory. The structures most sensitive to early neonatal DZP exposure are the mammillary body, limbic cortices and sensory regions that all contain a high density of benzodiazepine binding sites.

Key words: [^{14}C]2-deoxyglucose; development; chronic treatment; diazepam; benzodiazepines; cerebral energy metabolism.

INTRODUCTION

Diazepam (DZP) has anxiolytic, sedative, hypnotic and anticonvulsant properties and is largely administered to neonates and epileptic women, even during pregnancy, for prophylaxis and treatment of convulsive seizures [6,17]. As a consequence of clinical administration, DZP has been associated with a number of complications in the newborn infant known as the "floppy infant syndrome" [27]. Early anticonvulsant treatments have adverse effects on the developing brain which is particularly vulnerable to injury when neurons and glial cells are proliferating, migrating, and differentiating [15]. All anticonvulsant drugs cross the placenta and accumulate in breast milk, causing undesirable effects such as poor weight gain, drowsiness and adverse effects on psychomotor development [31].

Animal studies have shown that perinatal exposure to various benzodiazepines (BZD) induces a decrease in body and brain weight [19,20,24] and long-lasting pathological changes, mainly gliosis and perivascular cuffing in the brains of the rats [26]. Perinatal exposure to benzodiazepines leads also to a variety of short- and long-term behavioral and biochemical changes in animals, including disturbances in locomotor, exploratory and social behavior [19,20,24,32,38,57], alterations in cerebellar GABA concentrations [30], in choline, serotonin and GABA uptake [25] and in the development of BZD and GABA receptors [28,38,39,50].

In a previous study we have been able to show that an early chronic DZP treatment from postnatal day 2-21 induces a decrease in blood glucose levels paralleled by a reduction in the efficiency of the pathway of cerebral amino acid biosynthesis from glucose, especially early in development [52]. The period of treatment chosen encompasses most of the rat's cerebral development phases. In terms of cerebral maturation, an 8-12 day-old rat corresponds to a human newborn baby, a 21-day-old rat is close to a 9-month-old human infant whereas a newborn rat corresponds to a 6-month human foetus or premature baby [14,49]. Therefore, the treatment used corresponds to a human perinatal DZP exposure. In the present study, in order to map the cerebral structures most sensitive to DZ during

development, and to correlate the metabolic effects of the drug to the distribution of central BZD receptors we studied at the short-and long-term consequences of an early postnatal DZP treatment from day 2-21 on local cerebral glucose utilization assessed by the quantitative autoradiographic [¹⁴C]2-deoxyglucose method [44,53]. The study was performed on 3 groups of animals treated from postnatal day 2-21, one exposed to DZ, one exposed to the dissolution vehicle as well as a third group receiving saline in order to evaluate possible effects of the dissolution vehicle on brain energy metabolism.

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological treatment

Groups of two adult female Sprague-Dawley rats and one male were mated together for 7 days. The animals were maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 h). Food and water were available *ad libitum*. After delivery, litter size was reduced to 12 pups for homogeneity. Rat pups received daily a subcutaneous injection of DZP ("Valium 10 mg/2 ml" injectable ampoules, Roche, Basel, Switzerland and Neuilly-sur-Seine, France) at the dose of 10 mg/kg from day 2 to 21 (day of birth was considered as day 0). Control animals received an equivalent volume of the dissolution vehicle (propylene glycol 40%, ethanol, 10%, benzyl alcohol 1.5%, sodium benzoate, 5%) and a third group of rats was treated with saline to discriminate the possible cerebral metabolic effects of the vehicle from those of DZP. The pharmacological treatment was the same inside each litter, either vehicle, DZP or saline for all animals to get pups all about the same size in the litter and to prevent the mother from rejecting the low weighted DZP-treated rats. However, to avoid a litter effect, the experiments were performed on a minimal number of 3 different litters for each treatment and age studied. The animals were injected between 08:30 and 09:30 a.m. and the experiments were performed about 2½ hrs later, i.e. between 11:00 and 12:00 a.m. Rats were studied at 4 postnatal ages, at 10 (P10), 14 (P14), 21 (P21) and 60 (P60) days. All experimentation was conducted in conformity with the 'Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings'.

Measurement of local cerebral glucose utilization

Local cerebral metabolic rates for glucose were measured by the [^{14}C]2-deoxyglucose (2DG) method described by Sokoloff *et al.* [53] and adapted to the developing rat in our laboratory [44]. The [^{14}C]2-deoxyglucose (4.625 MBq/kg; spec. act., 1.65-2.04 GBq/mol; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) was injected as an i.v. pulse (125 $\mu\text{l}/100\text{ g}$) at about 2½ hrs after the injection of DZP, vehicle or saline. Nine to 12 timed arterial blood samples were drawn during the following 45 min for the measurement of plasma concentration of 2DG and glucose, as previously described [44]. At approximately 45 min after the pulse of 2DG, the animals were killed by decapitation. Brains were rapidly removed, frozen and cut into 20- μm coronal sections. Sections were autoradiographed on Kodak SB5 film along with calibrated [^{14}C]methylmethacrylate standards calibrated for their ^{14}C concentration in brain sections. The autoradiographs were analyzed by quantitative densitometry with a computerized image processing system (Biocom 200, Les Ulis, France) or a manual microdensitometer (Macbeth, TD901, Kollmorgen Co., Newburgh, U.S.A.) without knowledge of the treatment of the animal. For final calculations, the exact time of blood sampling was corrected for the time lag due to the residual volume of blood in the catheter, as previously described [44]. Local rates of cerebral glucose utilization were then calculated according to the operational equation of the method [53].

Physiological functions

Mean arterial blood pressure was measured over the whole 2DG procedure. Just prior to the tracer injection and to sacrifice of the animals, a sample of arterial blood was taken for measurement of blood pH, pO_2 and pCO_2 and of hematocrit.

Statistical analysis

Local cerebral metabolic rates for glucose were determined in 66 structures in 12 groups of 4-8 animals each, 4 groups of vehicle-, 4 groups of saline- and 4 groups of DZP-

exposed rats. The values of glucose utilization and of physiological variables in the vehicle group were compared to the values in the saline and DZP group by means of Dunnett's t-test for multiple comparison.

RESULTS

Effects of diazepam treatment on physiological variables

DZP treatment induced a decrease in body weight which was significant at all ages studied, even at P60, i.e. at 40 days after the end of the treatment, as previously shown [52]. Otherwise, DZP treatment had no major effects all physiological variables measured (data not shown).

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization

At P10, the effect of DZP treatment on LCMRglcs was significant in 13 areas. These were 4 sensory regions, namely lateral lemniscus, inferior and superior colliculi, olfactory cortex (Table 1), 4 limbic structures, lateral habenula, interpeduncular nucleus, dorsal tegmentum and pontine gray (Table 2), red nucleus (Table 3), and the 4 parts of mammillary body (Table 4).

At P14, the effect of DZP on cerebral glucose utilization was significant in 48 structures. Among sensory regions were the medial geniculate body, all visual areas, the olfactory cortex and vestibular nucleus (Table 1). LCMRglcs were also decreased by DZP in most limbic structures, except frontal cortex, accumbens nucleus, central amygdala, hippocampal CA1 and dentate gyrus regions and medial habenula (Table 2). Within motor areas, 10 showed significantly decreased rates of glucose utilization, except globus pallidus, substantia nigra pars reticulata and cerebellar cortex (Table 3). In hypothalamus and white matter, LCMRglc was decreased but DZP in all structures but ventromedian nucleus, the posterior part of the mammillary body (Table 4) and genu of the corpus callosum (Table 5).

At P21, DZP exposure significantly decreased LCMRglcs in 23 structures compared to animals exposed to the vehicle. These were 2 auditory regions, the 3 visual structures,

olfactory cortex and vestibular nucleus (Table 1). Among limbic regions, rates of glucose utilization were affected in frontal and anterior cingulate cortices, lateral habenula, mediodorsal thalamus, interpeduncular nucleus, medial and dorsal raphe nuclei, locus coeruleus, dorsal tegmentum and pontine gray (Table 2). Within motor regions, glucose utilization was decreased by DZP in sensory-motor cortex, caudate nucleus, ventrolateral thalamus and red nucleus (Table 3). In hypothalamus, local cerebral metabolic rates for glucose were decreased only in the medial and posterior nuclei of the mammillary body (Table 4).

At P60, i.e. at 40 days after the end of the drug exposure, LCMR_{glc}s decreased in 14 brain regions. These were medial and lateral geniculate body, olfactory cortex (Table 1), 3 limbic cortices, the 2 septal regions, hippocampal CA1 area (Table 2), caudate nucleus (Table 3), 3 parts of the mammillary body (Table 4) and internal capsule (Table 5).

Effects of vehicle on local cerebral glucose utilization

Compared to saline, the chronic administration of the dissolution vehicle to the rats had no effect at P10, induced significant increases of LCMR_{glc}s in a few brain regions at P14 (n=9) and P60 (n=11) and some decreases at P21 (n=5). At P14, rates of glucose utilization increased in vehicle- over saline-exposed rat levels in 3 limbic regions, i.e. accumbens nucleus, the dorsal part of central gray matter and pontine gray, and in 6 motor regions, namely subthalamic nucleus, substantia nigra pars compacta, cerebellar cortex and the 3 cerebellar nuclei (data not shown). At P60, glucose utilization in vehicle-treated animals remained increased over levels in saline-exposed rats in 11 regions (Fig. 1). These were 3 sensory areas, 5 limbic structures, the dorsomedial caudate nucleus and the 3 white matter areas. Conversely, at P21, rates of glucose utilization were lower in vehicle- than in saline-treated rats in 5 structures, inferior colliculus, cochlear nucleus, dorsal tegmentum, globus pallidus and dentate nucleus (data not shown).

DISCUSSION

The results of the present study show that early chronic DZP exposure has marked effects on LCMRglcs mostly at P14 and that this drug treatment induces also some specific long-term depressions on LCMRglcs in young adult rats.

Choice of the drug and administration vehicle

Most of the benzodiazepines are insoluble in water and other solvents have to be added in formulations of these drugs for injection. Glycofurol and propylene glycol have often been used commercially as vehicles for diazepam, and Tween 80 is also commonly used for drug suspension in the laboratory. In the present study, the commercial preparation of DZP from Roche (Valium injectable) contains propylene glycol. Propylene glycol has relatively low biological activity, does not affect electrical or chemical seizure thresholds or pharmacological potency of anticonvulsants [9,40]. Glycofurol solvent has a much higher biological activity, potentiating the action of medazepam [9] and increasing seizure thresholds [40]. The suspension of benzodiazepines in Tween 80/water reduces their anticonvulsant activity [9]. For these reasons, we chose the commercial preparation of diazepam from Roche (Valium injectable).

Correlation between the regional effects of diazepam on cerebral glucose utilization and the localization of benzodiazepine receptors

Highest densities of central BZD binding sites both in adults and during development are found in the cerebral cortex, forebrain limbic system and cerebellum. Lowest densities are observed in the thalamus and brainstem [11,47,64]. In the present study, both during DZP treatment and at P60, there is no homogeneous correlation between BZD receptor density and DZP-mediated metabolic effects. Indeed, metabolic depressions and high BZD receptor densities are observed in all cerebral cortical areas, the visual system, some anterior and posterior limbic regions and the mammillary body. In other areas (auditory structures, substantia nigra, hypothalamus), a high density of BZD receptors is present and

metabolism is not affected by DZP while the reverse is true for caudate nucleus, ventral tegmental area, central and pontine gray, locus coeruleus and dorsal tegmentum.

The apparent mismatch between receptor localization and metabolic changes is related to the fact that, conversely to the mapping of receptor localization, the 2DG method maps not only the primary site of action of a drug but also the structures that are affected secondarily to effects on afferent pathways. Therefore, functional changes at the receptor site can translate into changes into either the site of action, the whole pathway, part of the pathway or only the target area. A quite similar partial relationship between the localization of BZD binding sites and decreases in LCMRglc has already been shown after the acute administration of DZP to adult rats [2,43].

While BZD is currently used as an anticonvulsant in neonates, its metabolic effects are also not directly related to the upregulation of BZD receptors recorded after generalized seizures in immature rats [58]. The number of BZD binding sites is increased not only in most parts of the limbic system, whose metabolism is depressed in the present study but also in the substantia nigra [58], known to be a key structure in seizure control mediated by GABA [13] where LCMRglc is not affected by DZP exposure at any age in the present study.

Short-term effects of early chronic diazepam treatment on local cerebral glucose utilization

At present, no data is available concerning the correlation between DZP exposure and LCMRglc in the immature brain. The effects of either acute or chronic DZP treatment on cerebral energy metabolism have only been studied in adult animals. According to the study and the dose (0.1-2.5 mg/kg), acute DZP treatment induces quite discrete to generalized metabolic depressions [2,35,37,43] which are usually at least partly correlated with the functions of the regions involved in the diverse acute effects of DZP [5,10,36,54].

In the present study, with the exception of the olfactory cortex, all structures whose LCMRglc is significantly depressed by DZP at P10 are posterior areas which are already metabolically more mature and exhibit higher basal levels of glucose use than most other parts of the brain. Conversely, at P14, when the rat brain is undergoing its period of brain

growth spurt with an active maturation of neuronal cell bodies, multiplication of glial cells and synaptogenesis [14], chronic DZP exposure decreases glucose metabolic rates in almost all brain structures.

In P10-P21 rats, the structures most sensitive to short-term effects of DZP exposure and affected at the 3 ages by the treatment appear to be the mammillary body and sensory regions. In most studies concerning the effects of acute or subacute DZP exposure in adult animals, LCMRglc is usually quite specifically affected in mammillary body, as in the present study. The latter structure has been shown to be sensitive both to DZP [2,35,37,43] and to β -carbolines known to have anxiolytic and convulsant properties [1,46]. DZP exposure still decreases LCMRglcs in many posterior limbic regions such as the raphe nuclei, locus coeruleus, dorsal tegmentum, pontine gray, and interpeduncular nucleus at P21. Most of the latter structures are directly involved in the sedative effects of DZP [23,37,51]. However, these structures as well as the mammillary body become metabolically tolerant to a subacute or chronic exposure to the BZD in adult animals [37] whereas, in the present study, LCMRglc remains depressed at P21, i.e. after 20 days of treatment. Most of these structures and especially mammillary body contain high densities of BZD receptors [11,47,64] and may therefore be especially vulnerable to the effects of persistent DZP exposure during the phase of maturation of BZD binding sites. Sensory regions also appear to be metabolically quite sensitive to and affected at all ages by DZP in P10-P21 rats. The latter regions are, on one hand, quite rich in BZD binding sites [11,47,64] and, on the other hand, undergoing extensive development since the newborn rat is very immature, especially blind, deaf and almost immobile [56]. The metabolic decrease recorded in sensory brain regions during the whole period of the anticonvulsant treatment is indicative of the great vulnerability of fast growing brain structures to DZP.

By P21, i.e. at 20 days after the onset of DZP exposure, the number of structures whose LCMRglc is affected by the treatment is greatly reduced (n=23) compared to P14 (n=48). Moreover, it is the only age at which the rather localized effects of the dissolution vehicle on LCMRglcs are depressant instead of stimulant. These two consequences of early DZP exposure are related to the decrease in the plasma half-life of DZ and to the marked

decrease in DZ circulating levels between P14 and P21 [52]. They may also reflect the onset of a tolerance phenomenon to DZP. Tolerance to the anticonvulsant, sedative and anxiolytic effects of BZP has been well documented [21,29]. However, it is worth noting that, in contrast to the rapid development of tolerance to the sedative effects of BZD [18], there is no tolerance to the BZD-induced locomotor effects [22], which may explain the remaining effects of the early DZP treatment on many motor regions at P21.

Long-term effects of early chronic diazepam treatment on local cerebral glucose utilization

BZD have well-known anxiolytic properties which are related to their depressant action on structures such as hippocampus, amygdala, mammillary body and associated regions [48]. In all metabolic studies on acute, subacute or chronic effects of BZD administration, mammillary body appears to be the structure most sensitive to the drug [2,35,36,43, and the present study]. Moreover, β -carboline, inverse agonists of the BZD receptor, known for their anxiogenic and convulsant properties, induce a stimulant effect on LCMRglc in mammillary body and hippocampus [1,46]. In the present study, the early exposure to DZP does not have long-term effects on LCMRglc in the amygdala which is also directly involved in the control of anxiety [12,63], as previously shown by Kelly *et al.* [35] in adult rats. Indeed, BZD are able to exert their anxiolytic effect even in amygdala-lesioned rats [59].

A well-known secondary effect of DZP is amnesia. Whether this effect is direct or related to the sedative, anxiolytic or cognitive depressant properties of DZP remains to be elucidated [10]. DZP decreases spatial memory of rats in the Morris water maze due to an impairment of memory storage independent on sedative effects [4,41]. These data have been confirmed by the improvement of memory storage by a β -carboline and its reversal by Ro 15-1788 [8]. The cerebral structures involved in the memory process are mainly hippocampus, amygdala, mammillary body, dorsomedian thalamus, prefrontal and cingulate cortex [16,55]. Specific lesions of dorsal hippocampus and amygdala are able to inhibit the memory process induced by the GABA antagonist bicuculline and to block the inhibition of this process by the GABA agonist muscimol [3]. Likewise, the lesion of the cingulate

cortex in mice induces a long-term loss of spatial memory in a T maze [42]. It worth noting that all the structures involved in the memory process have a high density of BZD binding sites [11,47,64] and may be particularly vulnerable to a DZP treatment during their period of active maturation, translating into a long-term impairment of memory functions.

The other systems in which LCMRglcs are greatly affected during the course of chronic DZP treatment and remain depressed in the P60 rat in the present study are sensory regions. Their vulnerability may be related both to their fast rate of development during exposure to the drug and to their high density of BZD binding sites [11,47,64]. Previous studies have shown that a prenatal exposure to DZ interferes with the development of auditory function [33,34]. Likewise, in adult rats, the acute injection of DZP reduces the reaction to sound [7] and decreases metabolic activity in auditory areas [2,35,37,43].

Comparison with the short- and long-term metabolic consequences of the early chronic exposure to phenobarbital

The results of the present study show that the consequences of early chronic DZP exposure on LCMRglcs are less marked than those of a similar phenobarbital treatment [45]. Indeed, with the latter anticonvulsant, LCMRglcs were massively reduced during the whole period of exposure and the long-term metabolic effects of phenobarbital were still significant in all functional systems [45]. Conversely, with DZP, the short-term effects on cerebral glucose utilization are essentially marked at P14 and the long-term effects mostly related to the functional systems known to be affected by DZP, even in adults. These data are in good accordance with the generally believed lower toxicity of DZP compared to phenobarbital. Indeed, unlike phenobarbital which has been shown to be able not only to disturb neuronal differentiation but also to destroy already formed neurons [60-62], DZP induces only neuronal damage when applied prenatally, i.e. affecting differentiating neurons [26].

In conclusion, early exposure to DZP from P2-P21 decreases massively cerebral glucose utilization only at P14. Already by P21, the effects of the drug are reduced and

seem to reflect the decreased half-life, reduced plasma level of DZ as well as a possible tolerance. Long-term metabolic consequences of the treatment are mainly related to the known effects of the BZP on anxiety, sedation and memory, as well as on the fast growing sensory systems. The long-term effects of the early chronic DZP exposure on behavior and learning are under current investigation.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U 272) and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Toxicologie N°91C0661). The authors wish to thank the Laboratoires Roche (Basel, Switzerland and Neuilly-sur-Seine, France) for the kind gift of Valium injectable ampoules (10 mg/2 ml).

REFERENCES

- [1] Ableitner, A. and Herz, A., Changes in local cerebral glucose utilization induced by the β -carbolines FG 7142 and DMCM reveals brain structures involved in the control of anxiety and seizure activity, *J. Neurosci.*, 7 (1987) 1047-1055.
- [2] Ableitner, A., Wüster, M. and Herz, A., Specific changes in local cerebral glucose utilization in the rat brain induced by acute and chronic diazepam, *Brain Res.*, 359 (1985) 49-56.
- [3] Ammassari-Teule, M., Pavone, F., Castellano, C. and McCaugh, J.L., Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage, *Brain Res.*, 551 (1991) 104-109.
- [4] Arolfo, M. and Brioni, J.D., Diazepam impairs place learning in the Morris water maze, *Behav. Neural Biol.*, 55 (1991) 131-136.
- [5] Balantuono, C., Reggi, G., Tognoni, G. and Garattini, S., Benzodiazepines clinical pharmacology and therapeutic use, *Drugs*, 19 (1980) 195-219.
- [6] Burdette, D.E., Benzodiazepines. In M. Dam and L. Gram (Eds.), *Comprehensive Epileptology*, Raven Press, New York, 1990, pp. 547-561.
- [7] Carlsson, C., Hägerdal, M., Kaasik, A.E. and Siesjö, B.K., The effects of diazepam on cerebral blood flow and oxygen consumption in rats and its synergistic interaction with nitrous oxide, *Anesthesiology*, 45 (1976) 319-325.
- [8] Chapoutier, G., Raffalli-Sebille, M.J., Venault, P., Simiand, J. and Dodd, R.H., Comparison between the effects of the benzodiazepine receptor ligands methyl beta-carboline-3-carboxylate and diazepam in two learning situations in mice, *Psychobiology*, 19 (1991) 58-63.
- [9] Crankshaw, D.P. and Raper, C., The effect of solvents on the potency of chlordiazepoxide, diazepam, medazepam and nitrazepam, *J. Pharm. Pharmacol.*, 23 (1971) 313-321.
- [10] Curran, H.V., Benzodiazepines, memory and mood: a review, *Psychopharmacology*, 105 (1991) 1-8.

- [11]Daval, J.L., Werck, M.C., Nehlig, A. and Pereira de Vasconcelos, A., Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to GABA receptors in the rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9 (1991) 307-320.
- [12]Davis, M., The role of amygdala in fear and anxiety, *Annu. Rev. Neurosci.*, 15 (1992) 353-375.
- [13]Depaulis, A., Vergnes, M. and Marescaux C., Endogenous control of epilepsy: the nigral inhibitory system, *Progr. Neurobiol.*, 42 (1994) 33-52.
- [14]Dobbing, J., Undernutrition and the developing brain. In W.A. Himwich (Ed.), *Developmental Neurobiology*, Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1968, pp. 241-261.
- [15]Dobbing, J., The later development of the brain and its vulnerability. In J.A. Davis and J. Dobbing (Eds.), *Scientific Foundations of Pediatrics*, Saunders, Philadelphia, 1974, pp. 565-577.
- [16]Duyckaerts, C., Seilhean D. and Delaere, P., Anatomie et mémoire, *Rev. Prat.*, 41 (1991) 869-873.
- [17]Farrel, K., Benzodiazepines in the treatment of children with epilepsy, *Epilepsia*, 27, Suppl 1 (1986) S45-S51.
- [18]File, S.E., Rapid development of tolerance to the sedative effects of lorazepam and triazolam in rats, *Psychopharmacology*, 73 (1981) 240-245.
- [19]File, S.E., Effects of neonatal administration of diazepam and lorazepam on performance of adolescent rats in tests of anxiety, aggressive behavior, learning and convulsions, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 8 (1986) 301-306.
- [20]File, S.E., The effects of neonatal administration of lorazepam on passive avoidance and on social, aggressive and exploratory behavior of adolescent male rats, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 8 (1986) 447-452.
- [21]File, S.E., The history of benzodiazepine dependence: a review of animal studies, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 14 (1990) 135-146.
- [22]File, S.E. and Pellow, S., No cross-tolerance between the stimulatory and depressant actions of benzodiazepines in mice, *Behav. Brain Res.*, 17 (1985) 1-7.

- [23] Foote, S.L., Bloom, F.E. and Aston-Jones, G., Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity, *Physiol. Rev.*, 63 (1983) 844-914.
- [24] Frieder, B., Epstein, S. and Grimm, V.E., The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups, *Psychopharmacology*, 83 (1984) 51-55.
- [25] Frieder, B. and Grimm, V.E., Some lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam, *J. Neurochem.*, 45 (1985) 37-42.
- [26] Frieder, B., Meshorer, A. and Grimm, V.E., The effect of exposure to diazepam through the placenta or through the mother's milk, *Neuropharmacology*, 23 (1984) 1099-1104.
- [27] Grimm, V., A review of diazepam and other benzodiazepines in pregnancy. In J. Yanai (Ed), *Neurobehavioral Teratology*, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 153-162.
- [28] Gruen, R.J., Elsworth, J.D. and Roth, R.H., Regionally specific alterations in the low-affinity GABA_A receptor following perinatal exposure to diazepam, *Brain Res.*, 514 (1990) 151-154.
- [29] Haigh, J.R.M. and Feely, M., Tolerance to the anticonvulsant effect of benzodiazepines, *Trends Neurosci.*, 9 (1988) 361-366.
- [30] Hannah, R.S., Spira, A.W. and Roth, S.H., The effects of two anticonvulsants on amino acid levels in the developing rat cerebellum, *Neurochem. Res.*, 14 (1989) 427-429.
- [31] Kaneko, S., Antiepileptic drug therapy and reproductive consequences: functional and morphological effects, *Reprod. Toxicol.*, 5 (1991) 179-198.
- [32] Kellogg, C.K., Benzodiazepines: influence on the developing brain. In G.J. Boer, M.G.P. Feenstra, M. Mirmiran, D.F. Schwaab and F. Van Haaren (Eds.), *Progress in Brain Research*, Vol 73, Amsterdam, Elsevier, 1988, pp. 207-228.
- [33] Kellogg, C.K., Ison, J. and Miller, M.K., Prenatal diazepam exposure: effects on auditory temporal resolution in rats, *Psychopharmacology*, 79 (1983) 332-337.
- [34] Kellogg, C.K., Tervo, I., Ison, J., Parisi, T. and Miller, M.K., Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats, *Science*, 207 (1980) 205-207.

- [35] Kelly, P.A.T., Ford, I. and McCulloch, J., The effect of diazepam upon local cerebral glucose use in the conscious rat, *Neuroscience*, 19 (1986) 257-265.
- [36] Lader, M., Clinical pharmacology of benzodiazepines, *Annu. Rev. Med.*, 38 (1987) 19-28.
- [37] Laurie, D.J. and Pratt, J.A., Local cerebral glucose utilization following subacute and chronic diazepam pretreatment: differential tolerance, *Brain Res.*, 504 (1989) 101-111.
- [38] Livezey, G.T., Marczyński, T.J. and Isaac, L., Enduring effects of prenatal diazepam on the behavior, EEG, and brain receptors of the adult cat progeny, *Neurotoxicology*, 7 (1986) 319-334.
- [39] Livezey, G.T., Marczyński, T.J. and Isaac, L., Prenatal diazepam: chronic anxiety and deficits in brain receptors in mature rat progeny, *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 8 (1986) 425-432.
- [40] Löscher, W., Nolting, B. and Fassbender, C.P., The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. I. The influence of administration vehicles, *Epilepsy Res.*, 7 (1990) 173-181.
- [41] McNamara, R.K. and Skelton, R.W., Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water maze, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 38 (1991) 651-658.
- [42] Meunier, M., Jaffard, R. and Destrade, C., Differential involvement of anterior and posterior cingulate cortices in spatial discriminative learning in a T-maze in mice, *Behav. Brain Res.*, 44 (1991) 133-143.
- [43] Nehlig, A., Daval, J.L., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Caffeine-diazepam interaction and local cerebral glucose utilization in the conscious rat, *Brain Res.*, 419 (1987) 272-278.
- [44] Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. and Boyet, S., Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development, *J. Neurosci.*, 8 (1988) 2321-2333.

- [45]Pereira de Vasconcelos, A., Boyet, S. and Nehlig, A., Consequences of an early chronic phenobarbital treatment on postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in the rat, *Dev. Brain Res.*, 53 (1990) 168-178.
- [46]Pratt, J.A., Laurie, D.J. and McCulloch, J., The effects of FG 7142 upon local cerebral glucose utilization suggest overlap between limbic structures important in anxiety and convulsions, *Brain Res.*, 475 (1988) 218-231.
- [47]Richards, J.G., Möhler, H., Schoch, P., Haring, P., Takacs, B. and Stahli, C., The visualization of neuronal benzodiazepine receptors in the brain by autoradiography and immunochemistry, *J. Receptor Res.* 4 (1984) 657-669.
- [48]Robinson, J.H. and Wang, S.C., Unit activity of limbic system neurons: effects of morphine, diazepam and neuroleptic agents, *Brain Res.*, 166 (1979) 149-159.
- [49]Romijn, H.J., Hofman, M.A. and Gramsbegen, A., At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term human newborn baby?, *Early Hum. Dev.*, 26 (1991) 61-68.
- [50]Rothe, T. and Bigl, V., The ontogeny of benzodiazepine receptors in selected regions of the rat brain: effect of perinatal exposure to diazepam, *Neuropharmacology*, 28 (1989) 503-508.
- [51]Saper, C.P., Function of the locus coeruleus, *Trends Neurosci.*, 10 (1987) 343-344.
- [52]Schroeder, H., Collignon, A., Uttscheid, L., Pereira de Vasconcelos, A. and Nehlig, A., Effects of early chronic diazepam treatment on incorporation of glucose and β -hydroxybutyrate into cerebral amino acids: relation to undernutrition, *Int. J. Dev. Neurosci.*, 12 (1994) in press.
- [53]Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., DesRosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. and Shinohara, M., The [14 C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat, *J. Neurochem.*, 27 (1977) 897-916.
- [54]Thiebot, M.H. and Soubrie, P., Behavioural pharmacology of the benzodiazepines. In E. Costa (Ed.), *The Benzodiazepines: From Molecular Biology to Clinical Practice*, Raven Press, New York, 1983, pp. 67-92.

- [55] Thompson, R.F., Memory, *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2 (1992) 203-208.
- [56] Tilney, F., Behavior and its relation to the development of the brain. II. Correlation between the development of the brain and behavior in the albino rat from embryonic states to maturity, *Bull. Neurol. Inst. N.Y.*, 2 (1933) 252-358.
- [57] Tucker, J.C., Benzodiazepines and the developing rat: a critical review, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 9 (1985) 101-111.
- [58] Werck, M.C. and Daval, J.L., Autoradiographic changes in central benzodiazepine binding sites and their coupling to γ -aminobutyric acid receptors after seizures in the developing rat, *Pediatr. Res.*, 30 (1991) 100-105.
- [59] Yadin, E., Thomas, E., Strickland, C.E. and Grishkat, H.L., Anxiolytic effects of benzodiazepines in amygdala lesioned rats, *Psychopharmacology*, 103 (1991) 473-479.
- [60] Yanai, J., An animal model for the effect of barbiturate on the development of the central nervous system. In J. Yanai (Ed.), *Neurobehavioral Teratology*, Elsevier, Amsterdam, 1984, pp. 111-132.
- [61] Yanai, J. and Bergman, A., Neuronal deficits after neonatal exposure to phenobarbital, *Exp. Neurol.*, 73 (1981) 199-208.
- [62] Yanai, J., Rosselini-Austin, L. and Tabakoff, B., Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital, *Exp. Neurol.*, 64 (1979) 237-244.
- [63] Young, B.J., Helmstetter, F.J., Rabchenuk, S.A. and Leaton, R.N., Effect of systemic and intra-amygdaloid diazepam on long-term habituation of acoustic startle in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 39 (1991) 903-909.
- [64] Young, W.S. and Kuhar, M.J., Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 212 (1980) 337-346.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Effects of the DZP dissolution vehicle on LCMRglcs compared to saline in various brain areas of the P60 rat. Data are represented as per cent of variation from the values in saline-exposed animals.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- and saline-treated rats.

Abbreviations: MGEN: medial geniculate body, LGEN: lateral geniculate body, OLFCX: olfactory cortex, PFCX: prefrontal cortex, CGCX: anterior cingulate cortex, INTPN: interpeduncular nucleus, PG: pontine gray, CAU: caudate nucleus, ICAP: internal capsule, GENU: genu of the corpus callosum, CBW: cerebellar white matter.

TABLE 1

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization in sensory systems of developing rats.

		P10	P14	P21	P60
Auditory System					
Auditory cortex	Veh	6.8 ± 0.8	18.0 ± 1.7	59.7 ± 5.4	114.2 ± 4.7
	DZP	5.3 ± 0.9	11.0 ± 0.7 *	44.6 ± 1.9 *	96.0 ± 4.3
Medial geniculate body	Veh	8.0 ± 0.9	22.3 ± 1.9	57.8 ± 5.2	102.3 ± 2.4
	DZP	6.4 ± 1.1	14.9 ± 1.2	41.1 ± 1.4 **	88.3 ± 3.2 *
Inferior colliculus	Veh	9.8 ± 1.3	19.6 ± 2.1	57.8 ± 2.9	111.8 ± 3.3
	DZP	5.5 ± 0.8 *	15.9 ± 0.6	58.0 ± 1.2	101.2 ± 5.1
Lateral lemniscus	Veh	12.3 ± 1.7	27.9 ± 2.8	54.6 ± 6.2	74.4 ± 2.0
	DZP	7.3 ± 0.5 *	26.1 ± 3.8	51.2 ± 1.7	67.8 ± 3.8
Superior olive	Veh	12.4 ± 1.4	40.3 ± 3.4	68.7 ± 9.6	101.6 ± 2.6
	DZP	8.3 ± 0.5	37.3 ± 2.8	65.9 ± 4.8	85.9 ± 4.7
Cochlear nucleus	Veh	17.9 ± 2.6	31.9 ± 2.8	65.3 ± 6.2	83.4 ± 3.9
	DZP	14.4 ± 1.1	27.7 ± 1.9	64.4 ± 1.8	79.4 ± 5.8
Visual system					
Visual cortex	Veh	5.7 ± 0.7	13.7 ± 1.4	43.6 ± 4.6	86.2 ± 4.3
	DZP	3.7 ± 0.7	9.4 ± 1.0 *	28.5 ± 1.6 *	71.6 ± 2.0
Lateral geniculate body	Veh	7.3 ± 0.9	16.5 ± 1.2	41.4 ± 2.8	80.1 ± 2.2
	DZP	4.6 ± 0.5	10.5 ± 1.1 *	28.4 ± 1.5 **	64.8 ± 2.2 **
Superior colliculus	Veh	6.9 ± 1.0	17.2 ± 1.8	41.9 ± 3.0	69.2 ± 2.1
	DZP	4.0 ± 0.7 *	9.8 ± 1.0 **	26.6 ± 1.8 **	62.5 ± 1.7
Olfactory system					
Olfactory cortex	Veh	14.0 ± 1.8	25.5 ± 2.3	48.8 ± 3.4	90.3 ± 1.5
	DZP	7.8 ± 0.8 **	15.6 ± 1.6 **	37.8 ± 2.0 *	73.8 ± 3.9 *
Vestibular system					
Vestibular nucleus	Veh	24.8 ± 3.1	44.9 ± 3.0	69.9 ± 5.5	98.3 ± 1.2
	DZP	16.9 ± 1.4	27.5 ± 2.1 **	56.8 ± 1.8 *	93.5 ± 4.5

Values, expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$, are means \pm S.E.M. of 4-8 animals.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- (Veh) and diazepam-treated animals (DZP).

TABLE 2

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization in limbic and functionally non specific areas of developing rats.

		P10	P14	P21	P60
Prefrontal cortex	Veh	6.1 ± 0.9	17.3 ± 1.6	49.7 ± 2.4	94.6 ± 2.4
	DZP	4.0 ± 1.0	11.1 ± 1.4 *	40.3 ± 2.8	77.4 ± 3.1 **
Frontal cortex	Veh	7.5 ± 1.0	20.9 ± 2.0	50.2 ± 2.1	81.9 ± 2.3
	DZP	5.4 ± 0.7	15.3 ± 1.4	39.9 ± 2.7 *	65.6 ± 1.8 *
Anterior cingulate cortex	Veh	5.2 ± 1.0	17.6 ± 1.8	46.6 ± 2.6	89.8 ± 2.2
	DZP	3.9 ± 0.7	10.3 ± 1.9 *	34.9 ± 2.8 *	73.5 ± 1.3 **
Entorhinal cortex	Veh	6.7 ± 0.8	14.3 ± 1.3	34.2 ± 1.7	50.5 ± 1.3
	DZP	5.1 ± 0.7	9.5 ± 0.8 *	28.5 ± 1.8	45.7 ± 1.7
Accumbens nucleus	Veh	6.5 ± 0.9	14.5 ± 1.6	35.7 ± 2.1	60.6 ± 2.4
	DZP	4.5 ± 0.8	9.9 ± 1.3	28.0 ± 1.7	57.6 ± 8.2
Medial septum	Veh	11.8 ± 2.0	24.0 ± 1.6	46.6 ± 4.2	72.6 ± 1.3
	DZP	6.6 ± 1.1	11.2 ± 1.1 **	37.0 ± 1.5	62.7 ± 3.2 *
Lateral septum	Veh	8.0 ± 1.1	17.8 ± 1.6	41.4 ± 3.5	59.1 ± 1.1
	DZP	5.2 ± 0.7	8.9 ± 0.9 **	33.8 ± 1.4	50.2 ± 3.6 *
Amygdala complex					
Medial nucleus	Veh	9.1 ± 1.1	15.3 ± 1.6	31.1 ± 3.5	43.1 ± 2.1
	DZP	8.1 ± 0.8	10.4 ± 1.4 *	25.8 ± 3.0	45.7 ± 2.5
Central nucleus	Veh	7.4 ± 0.9	14.2 ± 1.7	28.8 ± 3.5	36.3 ± 1.9
	DZP	6.2 ± 0.7	9.6 ± 1.3	26.8 ± 3.1	34.1 ± 3.3
Basolateral nucleus	Veh	10.4 ± 1.4	21.4 ± 1.7	51.0 ± 4.8	73.2 ± 2.0
	DZP	8.5 ± 1.1	13.3 ± 1.6 **	42.9 ± 2.9	66.4 ± 5.5
Basomedial nucleus	Veh	10.3 ± 1.2	18.5 ± 1.8	36.4 ± 3.9	46.2 ± 1.2
	DZP	8.3 ± 1.1	11.5 ± 1.4 **	34.0 ± 4.0	42.9 ± 3.0
Dorsal hippocampus					
CA1 area	Veh	10.6 ± 1.3	17.8 ± 1.6	42.0 ± 2.7	63.4 ± 1.9
	DZP	8.3 ± 1.1	13.0 ± 1.4	34.5 ± 2.8	50.5 ± 4.1 *
CA3 area	Veh	16.4 ± 1.7	25.2 ± 2.1	48.7 ± 3.4	62.9 ± 1.6
	DZP	13.5 ± 1.8	17.7 ± 1.1 **	41.4 ± 3.2	59.9 ± 5.1
Dentate gyrus	Veh	12.1 ± 1.5	15.9 ± 1.7	35.3 ± 3.5	47.3 ± 1.8
	DZP	10.2 ± 1.3	12.0 ± 1.0	32.3 ± 2.9	39.6 ± 3.4
Medial habenula	Veh	21.2 ± 2.4	36.7 ± 1.7	59.7 ± 4.6	59.1 ± 2.2
	DZP	16.4 ± 2.0	28.4 ± 2.5	52.8 ± 2.4	49.8 ± 3.7
Lateral habenula	Veh	18.2 ± 2.0	32.6 ± 1.9	68.9 ± 5.3	81.0 ± 3.2
	DZP	11.8 ± 1.4 *	21.4 ± 2.3 **	54.2 ± 1.7 *	71.5 ± 5.2
Interpeduncular nucleus	Veh	20.6 ± 2.5	32.4 ± 1.8	56.1 ± 2.8	75.2 ± 2.7
	DZP	12.4 ± 0.8 *	24.5 ± 2.6 *	42.0 ± 2.7 **	68.7 ± 1.7
Ventral tegmental area	Veh	11.8 ± 1.9	25.5 ± 1.6	53.6 ± 3.7	56.7 ± 1.1
	DZP	9.5 ± 1.1	17.1 ± 1.3 **	47.2 ± 2.7	53.3 ± 3.6

TABLE 2 (continued)

		P10	P14	P21	P60	
Mesencephalic reticular formation	Veh	7.8 ± 1.5	20.6 ± 1.8	51.9 ± 3.8	67.0 ± 2.3	
	DZP	6.5 ± 0.9	11.4 ± 0.5 *	43.8 ± 1.8	61.4 ± 3.0	
Central gray matter						
Dorsal nucleus	Veh	5.9 ± 1.1	14.6 ± 1.6	45.9 ± 4.0	57.3 ± 1.2	
	DZP	4.9 ± 0.5	7.3 ± 0.7 **	38.2 ± 2.5	55.7 ± 4.4	
Lateral nucleus	rostral part	Veh	7.5 ± 1.2	18.2 ± 1.3	48.2 ± 3.7	62.8 ± 1.7
		DZP	5.8 ± 0.7	9.1 ± 0.5 **	39.3 ± 2.4	61.0 ± 4.6
	caudal part	Veh	7.4 ± 1.1	13.6 ± 1.6	41.8 ± 4.1	54.6 ± 2.0
		DZP	5.9 ± 0.6	8.6 ± 1.1 *	40.1 ± 2.4	53.1 ± 5.0
Ventrolateral nucleus	Veh	9.3 ± 1.4	14.8 ± 1.4	41.0 ± 3.6	52.9 ± 2.4	
	DZP	6.7 ± 0.6	8.5 ± 0.9 **	37.5 ± 2.4	51.1 ± 4.9	
Medial raphe	Veh	15.2 ± 2.1	28.6 ± 2.5	66.9 ± 5.0	90.2 ± 3.4	
	DZP	11.1 ± 0.9	16.6 ± 1.2 **	54.2 ± 1.8 *	84.3 ± 6.2	
Dorsal raphe	Veh	11.0 ± 1.6	20.4 ± 2.0	54.9 ± 3.7	66.8 ± 3.4	
	DZP	8.9 ± 1.0	11.9 ± 1.0 **	41.8 ± 2.6 **	64.5 ± 5.5	
Locus coeruleus	Veh	17.3 ± 2.5	23.9 ± 2.2	47.3 ± 2.4	55.3 ± 2.7	
	DZP	12.4 ± 1.4	17.0 ± 0.9 *	34.8 ± 4.2 *	48.2 ± 4.3	
Dorsal tegmentum	Veh	22.3 ± 2.5	31.1 ± 1.9	56.2 ± 6.1	92.7 ± 4.8	
	DZP	15.5 ± 1.4 *	19.0 ± 2.2 **	40.4 ± 2.5 *	81.1 ± 5.7	
Pontine gray	Veh	9.7 ± 1.4	19.8 ± 1.9	38.5 ± 4.8	59.1 ± 2.4	
	DZP	5.5 ± 0.7 *	11.3 ± 1.1 **	27.7 ± 1.7 *	51.2 ± 1.8	

Values, expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$, are means \pm S.E.M. of 4-8 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- (Veh) and diazepam-treated animals (DZP).

TABLE 3

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization in motor areas of developing rats.

		P10	P14	P21	P60
Sensorymotor cortex	Veh	7.9 ± 1.1	22.9 ± 2.4	52.6 ± 2.4	88.6 ± 4.7
	DZP	5.4 ± 0.5	15.4 ± 1.7 *	40.9 ± 2.9 *	74.6 ± 1.6
Dorsomedial caudate nucleus	Veh	6.7 ± 1.1	18.5 ± 1.7	51.3 ± 3.2	89.4 ± 3.4
	DZP	3.7 ± 0.6	10.2 ± 1.3 **	36.7 ± 2.7 **	73.5 ± 1.5 *
Globus pallidus	Veh	6.2 ± 1.1	12.7 ± 1.6	27.1 ± 2.1	42.4 ± 2.3
	DZP	3.8 ± 0.7	8.5 ± 1.4	21.3 ± 0.9	35.6 ± 1.4
Subthalamic nucleus	Veh	13.6 ± 1.8	24.7 ± 1.4	54.2 ± 3.8	80.5 ± 2.1
	DZP	9.0 ± 0.9	15.3 ± 0.8 **	44.0 ± 2.7	66.8 ± 4.6
Substantia nigra pars reticulata	Veh	8.4 ± 1.5	17.8 ± 1.3	47.7 ± 3.3	55.7 ± 2.1
	DZP	6.8 ± 0.9	13.4 ± 1.1	44.1 ± 2.3	52.5 ± 3.7
Substantia nigra pars compacta	Veh	12.5 ± 1.9	26.0 ± 1.8	55.7 ± 3.7	66.4 ± 1.4
	DZP	10.2 ± 1.3	16.8 ± 1.2 **	48.3 ± 2.1	62.4 ± 4.0
Red nucleus	Veh	10.2 ± 1.5	22.4 ± 1.5	44.9 ± 3.8	67.1 ± 1.7
	DZP	6.1 ± 0.4 *	13.4 ± 1.2 **	31.4 ± 1.8 **	58.9 ± 2.4
Cerebellar cortex	Veh	9.9 ± 1.6	14.5 ± 1.2	24.3 ± 1.9	42.0 ± 1.5
	DZP	8.0 ± 1.1	11.3 ± 2.2	20.6 ± 1.1	38.4 ± 1.6
Cerebellar nuclei					
Dentate nucleus	Veh	13.0 ± 1.7	31.6 ± 3.2	54.9 ± 5.2	79.7 ± 2.0
	DZP	11.7 ± 1.1	20.2 ± 1.8 *	47.4 ± 1.7	75.0 ± 4.1
Interpositus nucleus	Veh	15.3 ± 2.2	33.8 ± 2.8	58.0 ± 5.3	79.8 ± 1.3
	DZP	13.4 ± 1.2	21.8 ± 1.6 **	49.3 ± 1.7	76.9 ± 3.5
Fastigial nucleus	Veh	16.0 ± 2.7	36.5 ± 3.1	59.8 ± 5.4	76.3 ± 1.8
	DZP	13.4 ± 1.2	22.1 ± 1.7 **	48.9 ± 1.7	74.7 ± 4.0

Values, expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$, are means \pm S.E.M. of 4-8 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- (Veh) and diazepam-treated animals (DZP).

TABLE 4

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization in the hypothalamus and the thalamus of developing rats.

		P10	P14	P21	P60
Hypothalamic areas					
Anterior hypothalamus	Veh	9.0 ± 1.3	14.3 ± 1.6	34.7 ± 4.5	53.4 ± 1.4
	DZP	6.5 ± 0.7	8.1 ± 0.7 **	24.3 ± 3.5	46.6 ± 3.8
Paraventricular nucleus	Veh	11.9 ± 0.8	17.7 ± 1.8	31.4 ± 3.9	47.4 ± 3.9
	DZP	10.5 ± 0.9	10.5 ± 1.5 **	22.4 ± 3.6	40.9 ± 3.1
Ventromedian hypothalamus	Veh	9.8 ± 1.1	12.9 ± 1.6	30.9 ± 4.2	44.6 ± 2.0
	DZP	7.9 ± 0.7	8.5 ± 1.4	28.1 ± 3.3	39.1 ± 4.7
Dorsomedian hypothalamus	Veh	11.8 ± 1.3	18.7 ± 1.9	38.6 ± 4.6	54.4 ± 2.2
	DZP	9.3 ± 1.1	11.7 ± 1.9 *	33.5 ± 3.4	47.9 ± 4.8
Posterior hypothalamus	Veh	10.4 ± 1.4	18.5 ± 1.3	44.9 ± 4.5	61.1 ± 2.2
	DZP	6.7 ± 0.9	10.9 ± 0.6 **	35.9 ± 3.2	51.1 ± 3.5
Mammillary body					
Medial nucleus	Veh	16.0 ± 1.8	29.2 ± 1.4	71.7 ± 8.0	106.6 ± 2.4
	DZP	10.1 ± 1.8 *	18.7 ± 1.7 **	53.8 ± 1.8 *	86.8 ± 6.2 *
Mediolateral nucleus	Veh	13.8 ± 1.6	27.2 ± 1.5	67.8 ± 7.5	109.7 ± 1.7
	DZP	8.5 ± 1.6 *	16.8 ± 1.6 **	53.5 ± 1.7	88.3 ± 5.1 *
Lateral nucleus	Veh	17.4 ± 2.2	26.0 ± 1.6	48.1 ± 5.7	61.8 ± 3.1
	DZP	10.1 ± 1.6 *	14.0 ± 1.4 **	36.6 ± 2.4	49.5 ± 4.3
Posterior nucleus	Veh	10.4 ± 1.5	21.0 ± 0.9	57.9 ± 6.1	114.5 ± 3.8
	DZP	6.1 ± 0.8 *	15.8 ± 1.9	39.5 ± 1.7 *	87.0 ± 5.0 *
Thalamic areas					
Ventral nucleus	Veh	16.8 ± 2.1	29.8 ± 2.4	54.8 ± 5.2	80.2 ± 3.5
	DZP	12.0 ± 1.8	20.8 ± 2.1 *	46.2 ± 1.2	72.0 ± 4.5
Lateral nucleus	Veh	8.6 ± 1.2	19.2 ± 1.2	49.1 ± 5.7	86.3 ± 4.5
	DZP	6.4 ± 1.0	10.2 ± 1.3 **	34.5 ± 2.2 *	71.8 ± 5.1
Mediodorsal nucleus	Veh	12.1 ± 1.4	24.3 ± 1.5	64.2 ± 6.5	105.7 ± 3.2
	DZP	10.4 ± 1.8	13.1 ± 1.3 **	44.9 ± 1.5 **	89.2 ± 6.6

Values, expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$, are means \pm S.E.M. of 4-8 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- (Veh) and diazepam-treated animals (DZP).

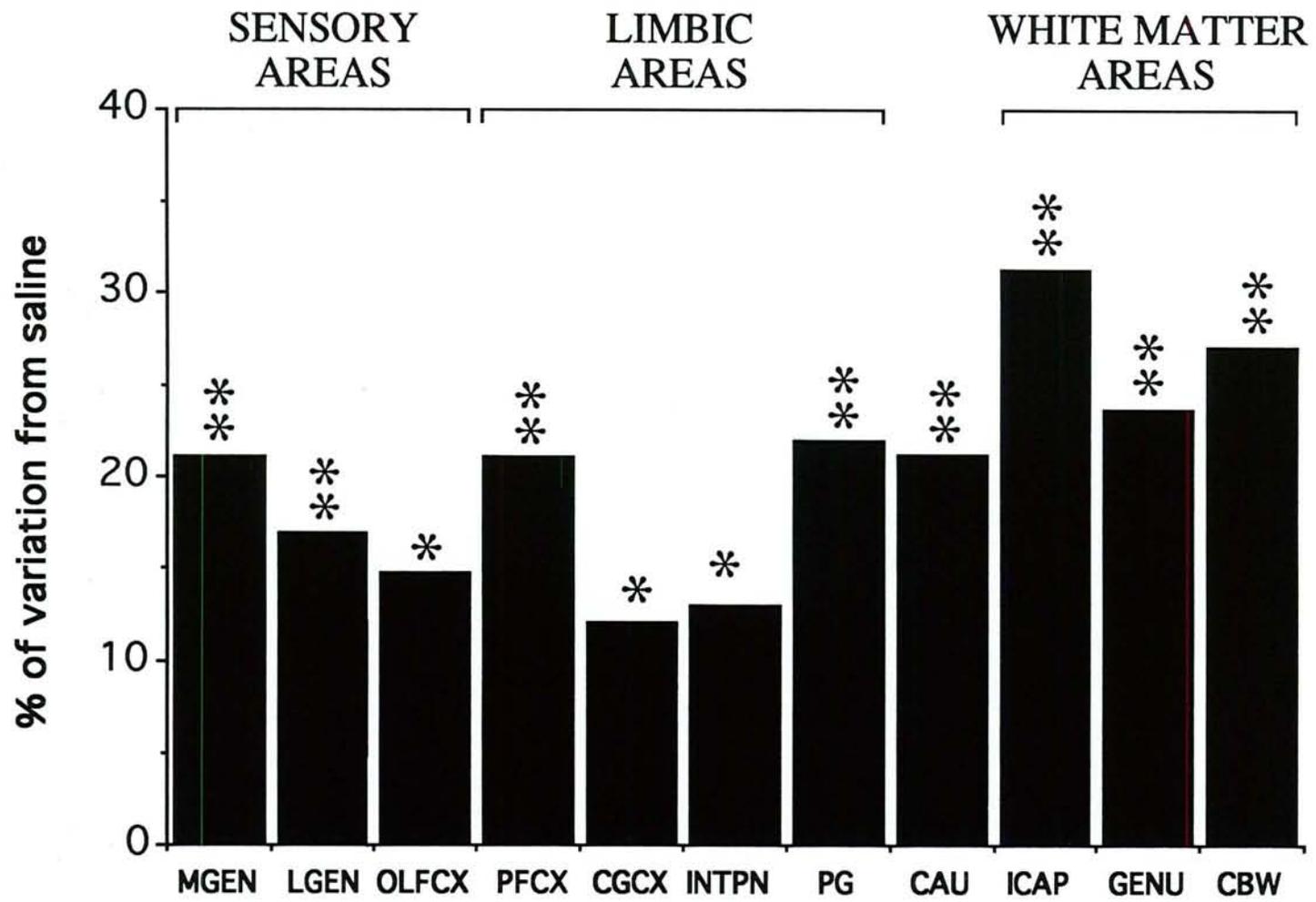
TABLE 5

Effects of diazepam on local cerebral glucose utilization in white matter areas of developing rats.

		P10	P14	P21	P60
Internal capsule	Veh	5.4 ± 0.9	10.3 ± 1.0	23.4 ± 2.0	25.8 ± 1.3
	DZP	3.4 ± 0.8	5.6 ± 1.1 *	19.6 ± 0.6	20.0 ± 0.9 *
Genu of corpus callosum	Veh	2.6 ± 0.7	8.9 ± 1.4	22.7 ± 0.9	19.0 ± 1.0
	DZP	2.6 ± 0.9	4.2 ± 1.3	20.0 ± 2.2	17.8 ± 0.8
Cerebellar white matter	Veh		18.4 ± 1.8	29.5 ± 4.5	34.3 ± 1.9
	DZP		10.2 ± 1.8 *	28.2 ± 2.7	32.9 ± 0.7

Values, expressed as $\mu\text{mol}/100\text{g}/\text{min}$, are means \pm S.E.M. of 4-8 experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between vehicle- (Veh) and diazepam-treated animals (DZP).



6. DIAZEPAM ET DEVELOPPEMENT NEUROMOTEUR

Le développement d'un comportement neuromoteur cohérent dépend de la maturation et de l'intégration fonctionnelle de nombreux systèmes au niveau central. A la naissance, le rat dispose, comme d'autres mammifères tel que l'homme, d'un répertoire neuromoteur très rudimentaire, la différenciation des systèmes cérébraux intervenant dans le contrôle de ces comportements n'étant en rien comparable à celle observée chez l'adulte.

L'évolution neuromotrice du rat s'effectue essentiellement au cours des 3 premières semaines de la vie postnatale, l'émergence des différents types de comportement locomoteur se faisant selon un ordre clairement établi (Altman et Sudarshan, 1975 ; Bolles et Woods, 1964 ; Westerga et Gramsbergen, 1990 ; *figure 18*).

Dès la naissance, le rat possède certaines activités motrices comme le retournement ou la nage alors qu'il ne marche pas (Bekoff et Trainer, 1979 ; Clarac, communication personnelle ; Westerga et Gramsbergen, 1990).

Ainsi, la reptation est la forme prédominante de locomotion entre le 1er et le 10ème jour après la naissance. Puis, elle est remplacée par la marche de type quadrupédique jusqu'à 17 jours de vie postnatale où commence à apparaître le comportement locomoteur typique de l'adulte (Altman et Sudarshan, 1975 ; Westerga et Gramsbergen, 1990). Par contre, en situation de nage, le rat présente, dès la naissance, une activité motrice qui est rythmée mais mal coordonnée, la coordination des mouvements entre les pattes antérieures et postérieures n'apparaissant que vers le 8ème jour de vie postnatale pour ne devenir parfaite qu'à partir de l'âge de 15 jours (Clarac, communication personnelle). L'apparition d'une coordination des mouvements entre les différentes pattes correspond à la maturation des motoneurons de la moelle épinière qui interviennent dans le contrôle de la motricité rythmique ainsi qu'à la mise en place de la voie corticospinale descendante qui jouerait un rôle dans la génération et la régulation de l'activité locomotrice chez le rat (Clarac, communication personnelle).

Par ailleurs, il semble que l'émergence de ces comportements soit directement influencée par divers facteurs environnementaux tels que la qualité des stimulations sensorielles. L'ouverture des yeux paraît ainsi avoir une influence non négligeable sur l'acquisition de nombreux comportements neuromoteurs chez le rat comme l'exploration, le reniflement, le redressement ou la rotation (Foreman et Altaba, 1992). De même, il semble que le développement neurocomportemental d'enfants prématurés soit plus rapide que celui de nouveau-nés à terme du fait de l'acquisition plus précoce de certaines fonctions visuelles (Foreman et coll., 1991), confirmant ainsi les données obtenues chez l'animal .

âge postnatal (jours)

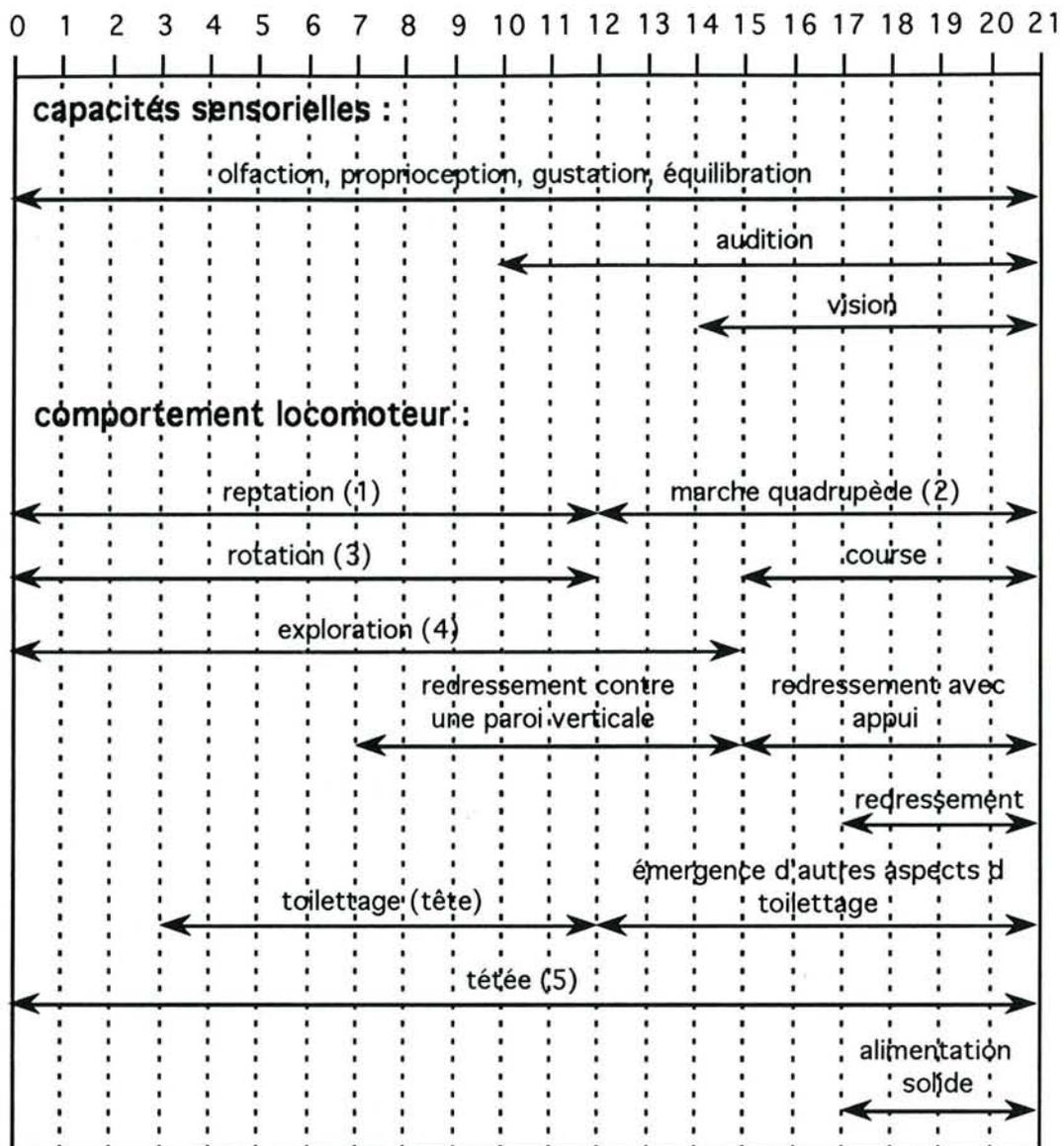


figure 18. Ages approximatifs où apparaissent différents aspects des capacités sensorielles et motrices du rat (d'après Spear, 1990).

- (1) reptation : mouvements vers l'avant avec le ventre en contact avec le sol.
- (2) marche quadrupédique : mouvements vers l'avant, le ventre n'étant plus en contact avec le sol.
- (3) rotation : mouvements de rotation de la partie avant du corps vers la droite ou la gauche à l'aide des pattes avant, les pattes arrières restant stationnaires.
- (4) exploration : capacité d'explorer et de pousser un objet avec le museau.
- (5) téter : au cours de cette période, le rat est capable d'ingérer indifféremment des liquides répandus sur le sol ou arrivant dans la cavité buccale.

Les nouveau-nés, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, sont donc capables de manifester un large répertoire de comportements moteurs dans des situations environnementales appropriées en même temps qu'une grande sensibilité à divers stimuli sensoriels, et ce tout au long du développement postnatal (*figure 18*).

L'acquisition de ces différentes fonctions constitue également la base physique et neurophysiologique de l'édifice comportemental de l'individu. Ainsi, des différences interindividuelles sont susceptibles d'apparaître au cours de la maturation de ces divers comportements et d'affecter à long terme, certains aspects tant individuels que sociaux de la vie de l'individu, aspects dans lesquels il fera intervenir ces différences.

6.1. Les tests d'évaluation du développement neuromoteur chez le rat

Les animaux ont été testés dans une batterie de 4 tests issus d'une échelle standardisée de mesure du développement neuromoteur du rat mise au point et validée par Gelly (1978), Desor (1979) et Deviterne (1981). Au cours de ces différents travaux, environ 15 000 jeunes rats ont été testés. Les courbes cumulées de réussite aux différents tests ont permis de déterminer, pour chaque épreuve, l'âge moyen de réussite, c'est-à-dire l'âge auquel au moins 50 % de la population testée ont réussi à effectuer l'épreuve qui était imposée.

Certains de ces tests font également partie d'une série d'épreuves conçue pour évaluer des syndromes ataxiques chez le rat ainsi que l'ensemble des manifestations neuromotrices qui l'accompagnent (Jolicoeur et coll., 1979).

Il s'agit, dans l'ordre chronologique d'exécution, des tests de retournement, de réaction anti-gravitaire, de suspension et de coordination locomotrice.

6.1.1. Test de retournement

a) principe

Le réflexe de retournement permet à l'animal, en cas de chute ou de déséquilibre, de retrouver une position dorso-ventrale normale. En effet, le jeune rat qui, fortuitement, au sein de la portée ou au cours d'une manipulation expérimentale, se retrouve placé sur le dos, tente de revenir à la position dorso-ventrale normale en effectuant une série de balancements et de torsions du corps alternés vers la gauche et vers la droite jusqu'à réussir à exécuter une rotation complète du corps qui le ramène à la position normale.

Cette modification expérimentale de l'orientation spatiale de l'animal suscite donc chez lui des réflexes ayant pour but de rétablir l'équilibre et la posture. Ces réflexes impliquent différents niveaux d'intégration périphériques et centraux tels que les structures labyrinthiques du système vestibulaire, les récepteurs musculaires et articulaires du cou, les

noyaux vestibulaires et le cervelet (Baillet et Nortik, 1992 ; Guyton, 1989 ; Lalonde et Botez, 1990). Le système vestibulaire fournit uniquement des informations sur la position de la tête dans l'espace ainsi que sur les accélérations linéaires et angulaires auxquelles l'organisme est soumis alors que les propriocepteurs du cou transmettent des informations tout aussi essentielles sur la position de la tête par rapport au reste du corps. Il est à noter également l'importance de l'information visuelle, et notamment du réflexe vestibulo-oculaire qui permet de percevoir l'environnement de façon stable et référencée malgré les mouvements de la tête, dans le maintien de l'équilibre et le déclenchement des réflexes posturaux (Gauthier et coll., 1994).

Le rôle essentiel du système vestibulaire est donc de participer à l'équilibration par un contrôle et une coordination permanente des mouvements réflexes du tronc, des membres, du cou, de la tête et des yeux.

Le réflexe de retournement apparaît très tôt après la naissance chez le rat et atteint sa perfection vers le 10ème jour de vie postnatale (Altman et Sudarshan, 1975 ; Bolles et Woods, 1964). D'autre part, le déplacement caudo-rostral du centre nerveux d'organisation de ce réflexe d'une position initialement bulbaire vers une localisation plus mésencéphalique au cours des premiers jours de vie postnatale fait de ce réflexe un bon indice de développement du SNC (Bignal, 1974).

b) protocole

Au 4ème jour de vie postnatale, le jeune rat est déposé sur le dos, sur une planche recouverte de feutrine, en veillant à ne lui appliquer aucune impulsion pour ne pas favoriser le retournement. On chronomètre le temps nécessaire à l'animal pour retrouver la position quadrupédique normale. La durée du test est limitée à 2 minutes, sachant que le 4ème jour est l'âge moyen de réussite pour un temps de 20 secondes.

6.1.2. Test de réaction anti-gravitaire

a) principe

Comme dans le cas précédent, il s'agit d'évaluer une réaction motrice en réponse à une position inhabituelle dans l'espace.

Le jeune rat est placé, la tête vers le bas, sur un plan incliné de 20° par rapport à l'horizontale. Il se met alors à pivoter pour revenir se placer face à la pente, la tête vers le haut. De la même façon que le retournement, ce mouvement de rotation est initié au niveau de la tête, son origine se situant au niveau des structures labyrinthiques du système vestibulaire et des propriocepteurs du cou.

Cependant, comme le système vestibulaire met en jeu des structures cérébrales essentiellement postérieures qui sont matures très tôt (Nehlig et coll., 1988), ce n'est pas le déclenchement de la réaction mais son déroulement qui permettra de mettre en évidence des différences interindividuelles au cours du développement. En effet, la rotation complète (180°) nécessite un bon niveau de coordination des pattes antérieures, surtout au moment du passage à l'horizontale (Altman et Sudarshan, 1975).

D'autre part, cette épreuve évalue la maturation du réflexe d'agrippement. En effet, le rat se rétablit dans la position normale en agrippant et en lâchant successivement et de façon alternée le support sur lequel il est posé.

Cette réaction de fermeture de la patte à la suite de la stimulation de la paume ou de la face palmaire des doigts a été mise en évidence dès le 19^{ème} jour de gestation chez le rat (Narayan et coll., 1971). Elle persiste pendant la 1^{ère} semaine de vie postnatale puis disparaît (Smart et Dobbing, 1971).

b) protocole

Au 9^{ème} jour après la naissance, le rat est placé dans le sens de la pente d'un plan incliné de 20° par rapport à l'horizontale et recouvert de feutrine, la tête vers le bas.

On chronomètre le temps nécessaire à l'animal pour effectuer un demi-tour complet et revenir se placer à la verticale, la tête vers le haut. La durée du test est limitée à 2 minutes, sachant que le 9^{ème} jour est l'âge moyen de réussite avec un temps de 30 secondes.

6.1.3. Test de suspension

a) principe

L'agrippement est le réflexe évalué dans ce test. Le rat qui se retrouve sans support matériel s'agrippe à un fil dès que ses pattes antérieures entrent en contact avec ce dernier. Une fois abandonné à cette situation, l'animal se retrouve en suspension jusqu'à ce qu'il lâche le fil et chute. La durée du test dépend donc de plusieurs facteurs comme la force musculaire, l'ouverture des yeux et l'émotivité.

Si le test est réalisé avant l'ouverture des yeux, les seuls facteurs qui semblent être en cause sont la fatigue et la force musculaire. Par contre, si l'animal a les yeux ouverts, le temps de suspension est fonction de la force musculaire et de l'émotivité. En effet, si le rat constate qu'il n'est pas suspendu à une très grande hauteur et "juge" la chute peu dangereuse, il peut se lâcher volontairement avec pour conséquence une réduction importante de la durée du test (Molinengo et Orsetti, 1976).

b) protocole

Au 10^{ème} jour, c'est-à-dire avant l'ouverture des yeux, les pattes antérieures de l'animal sont amenées au contact d'un fil de fer d'un diamètre de 1 mm, tendu entre les montants d'un chassis à une hauteur de 20 cm, ce qui a pour effet de déclencher immédiatement une réaction d'agrippement. Le rat est ensuite lâché lentement.

On chronomètre la durée pendant laquelle l'animal reste suspendu depuis le lâcher jusqu'à la chute. Une plaque de plexiglas est placée devant l'animal pour l'empêcher de s'enrouler autour du fil.

La durée du test n'est pas limitée, sachant que 12 jours représentent l'âge moyen de réussite à ce test avec une durée de 10 secondes.

6.1.4. Test de coordination locomotrice

a) principe

C'est une épreuve qui nécessite une bonne coordination des 4 membres dans différentes conditions ainsi qu'un effort physique important. Appliquée à un âge proche du sevrage, elle s'appuie sur le fait que le jeune rat, au cours de la 3^{ème} semaine de vie postnatale, et plus particulièrement après l'ouverture des yeux, explore de plus en plus son environnement et affirme de façon croissante son autonomie (Altman et Sudarshan, 1975 ; Bolles et Woods, 1964).

Cette phase correspond également au moment où l'animal commence à manifester un comportement locomoteur comparable à celui observé chez l'adulte ainsi qu'un accroissement très important de sa résistance physique (Altman et Sudarshan, 1975 ; Westerga et Gramsbergen, 1990).

Ce test, inspiré de ceux mis au point par Altman et Sudarshan (1975) dans le but de mettre en évidence de nouvelles acquisitions motrices, se décompose en 3 phases :

1. une phase de natation qui permet de motiver le rat à escalader une tige filetée qu'il rencontre obligatoirement en nageant le long de la paroi.
2. une phase d'escalade de la tige sur une hauteur de 35 cm qui permet de mettre en évidence l'état de développement de la coordination motrice des 4 membres et de la résistance physique
3. une phase de rétablissement sur une plate-forme qui permet d'une part de donner un but et un terme à l'escalade de la tige et d'autre part de rendre le test encore plus sélectif quant à la coordination locomotrice et à la force physique.

Ce test ne peut pas être pratiqué avant l'âge de 19 à 20 jours. En effet, les rats ne sont pas capables de se rétablir sur une plate-forme après l'escalade d'une tige ou d'une corde avant ce stade du fait d'une relative immaturité dans la coordination des pattes postérieures (Altman et Sudarshan, 1975), alors qu'ils laissent apparaître une bonne coordination des 4 membres lorsqu'ils nagent dès la fin de la première semaine de vie postnatale (Bekoff et Trainer, 1979 ; Clarac, communication personnelle).

b) protocole

Au 20^{ème} jour après la naissance, le rat est mis à l'eau dans un récipient cylindrique (hauteur : 23 cm ; diamètre : 15 cm) rempli à mi-hauteur. L'animal a la possibilité de sortir de l'eau en grimpant le long d'une tige métallique filetée (diamètre : 8 mm) qui plonge dans l'eau à une distance du bord telle que le rat est obligé de la toucher lorsqu'il longe la paroi en nageant. Une plate-forme, fixée sur la tige à 35 cm au-dessus de l'eau, permet à l'animal de se rétablir après la grimpe.

Le chronomètre est déclenché lorsque le rat est lâché dans l'eau. On mesure le temps mis par l'animal pour réussir le test, c'est-à-dire entre le moment de la mise à l'eau et celui du rétablissement sur la plate-forme, ainsi que les temps intermédiaires mis pour sortir de l'eau, pour grimper le long de la tige et pour se rétablir sur la plate-forme.

La durée du test est limitée à 4 minutes, sachant que plus de 90 % des rats réussissent l'épreuve en moins de 3 minutes à partir du 18^{ème} jour de vie postnatale. Le temps de 4 minutes représente également un moment où le rat, trop épuisé, ne pourra plus réussir ce test.

6.2. Effets des BZD sur le développement neuromoteur du rat

L'utilisation de tests comportementaux issus d'une échelle standardisée de mesure du développement neuromoteur chez le rat représente un bon moyen d'évaluer les effets d'une exposition précoce à des drogues potentiellement toxiques comme les BZD car ils permettent de mettre en évidence des déficits qui peuvent être transitoires et ne plus apparaître chez l'adulte. Par ailleurs, ces types de tests ont été récemment recommandés pour faire partie du screening toxicologique des drogues potentiellement toxiques et susceptibles d'être utilisées chez des nouveau-nés et des enfants humains (Geyer et Reiter, 1985 ; Spear, 1990).

D'autre part, dans le cas de la présente étude, les résultats de ces tests devraient permettre d'établir un lien éventuel entre les déficits neuromoteurs qui pourraient être observés chez les animaux traités avec le DZ et les modifications du métabolisme énergétique cérébral qui ont été mises en évidence dans les études précédentes (cf. chapitres 3 et 4 ; Schroeder et coll., 1994a, 1994b).

6.2.1. Exposition prénatale

De nombreuses études se sont intéressées aux effets des BZD administrées au cours de la gestation sur le développement neuromoteur du rat.

Ainsi, le DZ, administré pendant les 3 semaines de gestation aux doses de 5 et 10 mg/kg, n'induit pas de modifications du réflexe de retournement pratiqué à 5 jours de vie postnatale (Frieder et coll., 1984a ; Gai et Grimm, 1982) alors que le CDP provoque un allongement du temps de retournement mais à un âge plus avancé, entre 9 et 13 jours (Pankaj et Brain, 1991). Le DZ induit également un retard dans les réactions neuromotrices observées chez le rat au stade de 5 jours lorsqu'il est placé sur un plan incliné dont on augmente la pente de manière progressive (Gai et Grimm, 1982). Cependant, ce retard ne semble pas être lié à une déficience de la force musculaire mais plutôt à des troubles de l'équilibre et du positionnement dans l'espace, le DZ ne provoquant pas d'allongement du temps de suspension mesurés chez des animaux âgés de 15 et 17 jours (Shore et coll., 1983). De la même façon, Myslivecek et coll. (1991) montrent que l'administration de DZ à une dose plus faible (1 mg/kg) au cours de la dernière semaine de gestation, induit un retard dans le développement neuromoteur ainsi que dans l'apparition de certains réflexes des jeunes rats.

L'administration chronique de DZ en période prénatale entraîne également une diminution de l'hyperactivité locomotrice normalement enregistrée vers le 16ème jour de vie postnatale (Cagiano et coll., 1990 ; Kellogg et coll., 1980 ; Shore et coll., 1983). Par contre, le CDP comme le DZ ne provoquent pas de modifications de l'activité locomotrice mesurée à 14 ou 20 jours de vie postnatale, c'est-à-dire avant ou après cette phase d'hyperactivité, dans divers tests comme l'open field ou la planche à trous (Adams, 1982 ; Perruzzi et coll., 1983 ; Shore et coll., 1983).

D'autre part, il a été démontré que le CDP comme le DZ induisent chez le rat ou la souris une réduction des cris de détresse ultrasoniques émis par de jeunes animaux séparés de leurs mères sans qu'il y ait modification de l'activité locomotrice de ces animaux, soulignant un possible effet anxiolytique des BZD chez l'animal immature (Kurishungal et coll., 1992).

6.2.2. Exposition postnatale

Comme dans le cas d'un traitement prénatal, l'administration de DZ ou de CDP pendant les premières semaines de vie postnatale ne provoque pas de modifications du réflexe de retournement mesuré au stade de 5 jours (Adams, 1982 ; Frieder et coll., 1984a). Par contre, dans ces conditions, le CDP induit, chez des rats âgés de 4 à 10 jours, un allongement du réflexe de retrait face au vide ainsi que des perturbations du comportement locomoteur lorsque les animaux sont placés en situation de nage (Adams, 1982).

L'administration chronique de CDP du 2ème au 21ème jour de vie postnatale induit une réduction de l'activité locomotrice mesurée en open field chez des rats âgés de 14 jours alors qu'elle n'a aucun effet significatif quand le test est pratiqué à 20 jours postnatals (Adams, 1982). Au contraire du CDP, le même traitement avec du DZ à la dose de 10 mg/kg provoque un accroissement de l'activité locomotrice des animaux dans un open field réalisé au 20ème jour après la naissance (Frieder et coll., 1984a).

Enfin, l'émission des cris de détresse ultrasoniques par des animaux placés en situation de stress n'est pas modifiée dans le cas d'une exposition chronique au DZ en période postnatale (File, 1986a).

Il ressort de ces différents travaux que l'administration chronique de BZD au cours de la gestation et/ou des premières semaines de la vie postnatale n'est pas sans conséquence sur le développement neurocomportemental du rat, confirmant ainsi les observations faites chez le nouveau-né et le prématuré humain (Laegreid et coll., 1989, 1992a, 1992b).

D'autre part, ces résultats indiquent que les récepteurs aux BZD pourraient jouer un rôle dans la maturation des systèmes neuronaux qui sous-tendent à l'apparition de comportements neuromoteurs au cours du développement postnatal. L'administration précoce de DZ pourrait ainsi modifier la réponse des récepteurs aux BZD vis-à-vis des ligands endogènes de même qu'elle pourrait induire des perturbations dans la fonctionnalité de ces récepteurs.

Les effets d'un traitement chronique précoce avec différentes BZD sont également modulés en fonction de la période au cours de laquelle le traitement est appliqué. En effet, il est possible que la maturation de l'un ou de l'ensemble des sous-types de récepteurs aux BZD soit modifiée en fonction de la période de traitement (File et Wilks, 1986), avec pour conséquence des comportements qui peuvent varier dans un même test selon les conditions d'application du traitement.

***"Behavioral and metabolic consequences of neonatal exposure to
diazepam in rat pups"***

H. Schroeder, A.C. Humbert, V. Koziel, D. Desor, A. Nehlig

Experimental Neurology, 1994 (en soumission)

Les travaux décrits dans les chapitres 3 et 4 (Schroeder et coll., 1994a, 1994b) montrent que l'administration quotidienne de DZ à une dose anticonvulsivante pendant les 3 premières semaines de vie postnatale chez le rat, induit, entre 5 et 21 jours après la naissance, une diminution significative de l'utilisation du glucose en tant que substrat du métabolisme énergétique cérébral principalement dans des structures impliquées dans la motricité, la vision, l'olfaction, l'audition et l'équilibration.

D'autre part, Laegreid et coll. (1989, 1990, 1992a, 1992b) ont récemment montré que des enfants exposés de manière chronique aux BZD in utero présentent un certain nombre de retards neuromoteurs touchant la posture et la motricité des membres ainsi qu'un retard dans l'apparition de la prise volontaire d'objets avec la main. Ces résultats indiquent que les BZD sont susceptibles de perturber la maturation des systèmes neuronaux qui interviennent dans la génération et le contrôle de ces comportements et qui sont plus particulièrement localisés au niveau du cortex, du tronc cérébral et du cervelet.

Il semblait donc intéressant d'étudier les conséquences de ces perturbations métaboliques dues au DZ sur le développement neuromoteur du rat dans le but de confirmer par un modèle animal ces observations faites chez le nouveau-né humain et de préciser le rôle de certaines régions du cerveau dans l'émergence et le contrôle de ces différentes activités motrices.

Les tests de retournement, de réaction anti-gravitaire, de suspension et de coordination locomotrice qui sont issus d'une échelle d'évaluation du développement neuromoteur du rat (Desor, 1979 ; Gelly, 1978), ont été pratiqués juste avant l'administration quotidienne du traitement en l'absence de toute trace plasmatique et cérébrale de DZ et/ou de DMDZ (Schroeder et coll., 1994a ; chapitre 2), chez des animaux âgés de 4, 9, 10 et 20 jours selon les protocoles décrits précédemment (cf. chapitres 1.2. et 5.1). Ces tests ont été réalisés dans 2 groupes de 129 et 105 rats traités, respectivement, avec le véhicule et le DZ. Pour chaque test, les performances des animaux exposés au DZ ont été comparées à celles obtenues chez les témoins traités avec le véhicule à l'aide des tests de Mann-Whitney et du Chi².

Au 4^{ème} jour de vie postnatale, le DZ n'induit aucune modification significative du réflexe de retournement par rapport au véhicule (tableau 1). Par contre, il provoque, à 9 et 10 jours, un allongement significatif des temps de réaction anti-gravitaire et de suspension de, respectivement, 77 et 21 % comparativement à celui mesuré dans le groupe véhicule (tableau 1). D'autre part, l'augmentation du temps de suspension mesurée chez les rats traités au DZ n'est pas corrélée avec le poids corporel ($r = 0,063$, $p = 0,521$). Elle traduit ainsi des modifications de la force musculaire, de la motricité, voire de l'émotivité chez ces animaux et non la diminution du poids corporel qui est induite par le DZ.

Tableau 1 : Effets d'une exposition chronique précoce au diazépam sur le développement neuromoteur du rat.

	VEHICULE (médiane - quartiles)	DIAZEPAM (médiane - quartiles)	Significativité
RETOURNEMENT (4 jours)			
temps (sec)	2,4 (1,8-3,6)	1,8 (1,2-3,0)	n.s.
réussite (%)	94,6	97,2	n.s.
REACTION ANTI-GRAVITAIRE (9 jours)			
temps (sec)	18,6 (11,0-29,9)	33,0 (19,5-54,0)	**
réussite (%)	98,4	95,2	n.s.
SUSPENSION (10 jours)			
temps (sec)	14,4 (9,6-21,6)	17,4 (12,6-24,2)	*
COORDINATION LOCOMOTRICE (20 jours)			
sortie			
temps (sec)	37,8 (28,2-55,4)	38,1 (28,8-65,4)	n.s.
réussite (%)	87,6	87,6	n.s.
ascension			
temps (sec)	10,2 (6,0-18,6)	10,2 (7,1-20,6)	n.s.
réussite (%)	93,8	88,0	n.s.
plateforme			
temps (sec)	9,0 (5,4-9,0)	13,2 (7,8-20,9)	**
réussite (%)	87,7	72,8	°
test			
temps (sec)	64,2 (50,3-92,6)	64,8 (50,3-93,2)	n.s.
réussite (%)	72,1	56,3	°
chutes			
0	66,4	65,2	n.s.
1	25,7	25,0	n.s.
2	6,2	7,6	n.s.
3	1,7	2,2	n.s.

** p < 0,01, * p < 0,05, différences significatives par rapport au véhicule (test de Mann Withney)

° p < 0,05, différence significative par rapport au véhicule (test du Chi²)

Dans l'épreuve de coordination locomotrice, le nombre d'animaux qui exécute correctement le test est significativement plus faible dans le groupe des rats exposés au DZ que dans celui traité avec le véhicule alors que le temps mis pour réaliser le test est identique dans les 2 groupes (tableau 1). Au cours du test, les phases de sortie de l'eau et de grimpe le long de la tige ne sont pas affectées par l'administration chronique de DZ (tableau 1). Par contre, le DZ induit, par rapport au véhicule, une augmentation significative du temps mis par les animaux pour se rétablir sur la plate-forme ainsi que du nombre de rats n'arrivant pas à se rétablir (tableau 1). D'autre part, le nombre d'animaux qui chutent au cours du test n'est pas différent entre les deux groupes et ce, quelque soit le nombre de chutes observé (tableau 1).

En conclusion, l'administration chronique de DZ en période postnatale induit globalement un retard du développement neuromoteur des animaux. Ce retard se traduit par des troubles de l'équilibre et de la motricité, reflétés par des perturbations des tests de réaction anti-gravitaire, de suspension et de coordination locomotrice. Ces modifications comportementales sont à mettre en relation avec les baisses significatives de l'UCLG qui ont été mises en évidence entre 10 et 21 jours dans différentes structures impliquées dans le contrôle de l'équilibre, la visuomotricité et le maintien de la posture comme le noyau vestibulaire, les noyaux du cervelet, le noyau rouge, les noyaux gris centraux et différentes régions du système visuel (Schroeder et coll., 1994b).

Certaines de ces structures qui sont localisées au niveau postérieur, sont matures très tôt sur le plan métabolique (Nehlig et coll., 1988) et semblent de ce fait, très sensibles à l'administration de DZ. En effet, c'est au cours de la période où les régions cérébrales postérieures sont particulièrement vulnérables, à savoir pendant les phases de croissance neuronale, de synaptogénèse et de maturation des différentes voies métaboliques, que les taux plasmatiques et cérébraux de DZ les plus élevés ont pu être observés (Schroeder et coll., 1994a).

D'autre part, les centres supérieurs tels que le thalamus ou le cortex visuel, qui mûrissent plus tardivement par rapport à des structures plus postérieures, paraissent également très sensibles à l'action du DZ. Ces régions sont particulièrement riches en récepteurs aux BZD et ce, dès la naissance (Daval et coll., 1991). Elles représentent donc des zones privilégiées de fixation du DZ dans le cerveau, avec des conséquences négatives sur la maturation du métabolisme cérébral et sur le comportement qui découle du développement de l'activité fonctionnelle cérébrale dans ces régions.

**BEHAVIORAL AND METABOLIC CONSEQUENCES OF NEONATAL EXPOSURE
TO DIAZEPAM IN RAT PUPS**

Henri SCHROEDER^{°*}, Anne-Claude HUMBERT[°], Violette KOZIEL[°], Didier DESOR!
and Astrid NEHLIG[°]

[°] INSERM U 272

Université de Nancy I

30 rue Lionnois

B.P. 3069

54013 NANCY-CEDEX

FRANCE

Phone: (33).83.37.35.59

Fax: (33).83.32.43.40

! CNRS UR 233

Université de Nancy I

Faculté des Sciences

Boulevard des Aiguillettes

54500 VANDOEUVRE-les-NANCY

FRANCE

* to whom all correspondence should be addressed

Key words: Diazepam; Benzodiazepines; Chronic treatment; Postnatal exposure; Neurobehavioral development; Cerebral glucose utilization.

Running head: Postnatal diazepam and behavioral development.

ABSTRACT

The short-term consequences of a neonatal exposure to diazepam (DZP) on neurobehavioral development and postnatal changes in local cerebral metabolic rates for glucose (LCMRglcs) in selected regions were studied in rats. Rat pups received a daily subcutaneous injection of 10 mg/kg DZP or of the dissolution vehicle from postnatal day 2 (P2) to 21 (P21). DZP did not affect the static righting reflex tested at P4 but increased suspension time at P10 and time to complete a 180° pivoting on an inclined plane at P9. In a locomotor coordination test performed at P20, swimming or climbing on a vertical pole was not affected by DZP while the drug impaired the ability of the rat to place its hindpaws on the horizontal platform after climbing. Likewise, DZP induced marked decreases (19-45%) in LCMRglcs in most structures studied at P10, P14 and P21. The results of the present study show that neonatal DZP treatment induces motor deficits that appear to be quite subtle, to concern mainly posture and body balance. They are not visible in tasks such as swimming or climbing but become obvious in more difficult tasks such as achieving a horizontal quadruped position on a platform after a climbing phase. Decreases in cerebral energy metabolism appear to be rather located in areas controlling posture and body balance and are well correlated with the locomotor impairments recorded in the present study.

INTRODUCTION

Benzodiazepines (BZD), since their introduction on the market in the 1960's, have become the most frequently prescribed of all psychotropic drugs, accounting for example for 88% of the hypnotic drugs prescribed in Sweden (7). About 10% of the French population take these drugs (57). Their popularity comes from their sedative, anxiolytic, muscle-relaxant and anticonvulsant properties and their large therapeutic index (9, 30, 32, 34). These drugs are often prescribed to women of childbearing age with a quite high percentage of women being exposed to tranquilizers and sedatives during pregnancy (33). Finally, BZD are also used in newborn and premature infants for the treatment and prevention of convulsive seizures (9, 18, 70).

BZD are highly liposoluble and cross rapidly the placental barrier. The concentrations of their metabolites can even be higher in the fetus than in the mother because of the immaturity of hepatic drug-metabolizing systems inducing a slow elimination of the drug in the fetus and newborn (50, 66). Moreover, some BZD like diazepam (DZP), nitrazepam and flunitrazepam are found in maternal milk. Indeed, lethargy, weight loss and adverse effects on psychomotor development are currently described consequences in breast-fed infants of mothers receiving BZD (35, 36).

On the basis of these clinical data, the effect of early benzodiazepine exposure on the developing brain have been of great concern (38, 69). Most studies have shown that early BZD exposure induces lasting consequences on the brain, both neurochemically and behaviorally (38, 69). Indeed, perinatal exposure to various BZD induces in animals a decrease in body and brain weight (20, 21, 23, 71) and long-term disturbances in locomotor, exploratory and social behavior (11, 20, 21, 23, 46, 55, 58, 69). Early BZD exposure also induces changes in neurotransmitter amino acid levels (31, 63), disturbances in choline, serotonin and GABA uptake in hippocampus and frontal cortex of rats (24) and alterations in the development of BZD and GABA receptors (28, 46, 47, 61).

In a previous study, we have been able to show that a neonatal exposure to DZP in the rat is able to induce a retardation in the active incorporation of glucose into cerebral amino acids (63). Cerebral glucose utilization and the acquisition of neurodevelopmental functions are closely related in most species (13, 41, 53). Therefore, in the present study, we looked at the neuromotor development of rat pups receiving a daily subcutaneous 10 mg/kg DZP injection from postnatal day 2-21, as in the previous study, in correlation with DZP-induced changes in local cerebral metabolic rates for glucose (LCMRglc) in structures involved in the control of the functions explored. The neuromotor development was assessed according to the time scale validated by Gelly (27) and Desor (15). LCMRglcs were measured by means of the quantitative autoradiographic [¹⁴C]2-deoxyglucose method of Sokoloff et al. (67) adapted to the immature rat (53). The period of treatment chosen encompasses most of the rat's cerebral development phases. In terms of cerebral maturation, an 8-12 day-old rat corresponds to a human newborn baby, a 21-day-old rat is close to a 9-month-old human infant whereas a newborn rat corresponds to a 6-month human foetus or premature baby (17, 60). Therefore, the treatment used corresponds to a human perinatal DZP exposure.

MATERIALS AND METHODS

Animals and pharmacological treatment. Two adult female Sprague-Dawley rats and one male were mated together for 7 days. The animals were maintained under standard laboratory conditions on a 12:12 h light/dark cycle (lights on at 06:00 a.m. for autoradiographic studies and at 01:00 a.m. for behavioral studies). Food and water were available *ad libitum*. After delivery, litter size was reduced to 12 pups for homogeneity. Rat pups received daily a subcutaneous injection of DZP ("Valium 10 mg/2 ml" injectable ampoules, Roche, Basel, Switzerland and Neuilly-sur-Seine, France) at the dose of 10 mg/kg from day 2 to 21 (day of birth was considered as day 0). Control animals received an equivalent volume of the dissolution vehicle (propylene glycol 40%, ethanol, 10%, benzyl alcohol 1.5%, sodium benzoate, 5%). The pharmacological treatment was the same inside each litter for all animals to get pups all about the same size in the litter and to prevent the mother from rejecting the low weighted DZP-treated rats. However, to avoid a

litter effect, the experiments were performed on 3-5 different litters in autoradiographic studies, i.e. on a total number of 36 animals, 4-8 for each treatment and age studied. In behavioral studies, 9-11 different litters were used for each treatment, i.e. a total number of 129 vehicle-exposed and 105 DZP-treated animals which all underwent the 4 tests explored.

In behavioral studies, the animals were injected between 09:00 and 12:00 a.m. and the experiments were performed at the same time of the day, just before the daily pharmacological treatment. At that time, there was no more DZP or metabolites present in the blood or brain of the rat pups (63). For neurobehavioral development, rats were studied at 4 ages, at 4 (P4), 9 (P9), 10 (P10) and 20 (P20) days after birth. In autoradiographic studies, the animals were injected between 08:30 and 09:30 a.m. and the experiments were performed about 2½ hrs later, i.e. between 11:00 and 12:00 a.m. Rats were studied at 3 developmental ages, at P10, P14 and P21. All experimentation was conducted in conformity with the 'Guiding Principles for Research Involving Animals and Human Beings'.

Behavioral studies. Daily inspections were made to control the influence of DZP treatment on the weight of the pups, hair growing and eyelid opening. The different behaviors studied were the righting reflex, negative geotaxis, suspension time and locomotor coordination.

Righting reflex. The static righting reflex was studied at P4. The time needed by the pup to right itself in a supine position was recorded. The duration of the test was limited to 120 sec since the mean time for a successful trial is a few sec at P4 (15, 27).

Negative geotaxis. This reflex was tested at P9. The rat was positioned the head downwards on an inclined plane with a 20% slope. The time needed for the pup to turn completely and reach a position with the head upwards on the inclined plane was measured. The duration of the test was limited to 120 sec since the mean time for a successful trial is 30 sec at P9 (15, 27).

Suspension time. This test was performed at P10. The rat pup was suspended by its front paws grasping a metal rod (1 mm diameter) which was stretched between the two poles of a frame at about 20 cm above the table. A plexiglas sheet was placed in front of the rat to prevent it from turning around the rod. The time the animal remained on the bar was recorded. There was no time limit in this test. The mean time for a successful trial is 10 sec at P12 (15, 27). This test was performed before eyelid opening to control muscle strength by itself and eliminate the participation of emotivity.

Locomotor coordination. This test adapted from Altman and Sudarshan (3) by Gelly (27) and Desor (15) was performed at P20. It is divided into three phases. During the first one, the rat is forced swimming in a round container (15 cm diameter and 23 cm height) half full of water. The animal is able to come out of the water by climbing along a metal rod (8 mm diameter) which is deep enough inside the water so that the rat necessarily encounters it during the swimming phase. The second phase represents the climbing period along the rod (35 cm). During the third phase, the animal reaches a platform on which it can restore a normal quadruped position after the climbing period. In this test, the time necessary for the rat to succeed in the test, i.e., to reach the platform with the four paws after being put inside the water was recorded. The times necessary to complete each of the three different phases of the test were also measured.

Measurement of local cerebral glucose utilization. LCMRglcs were measured by the [¹⁴C]2-deoxyglucose (2DG) method described by Sokoloff *et al.* (67) and adapted to the developing rat in our laboratory (53). The 2DG (4.625 MBq/kg; spec. act., 1.65-2.04 GBq/mol; Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay, France) was injected as an i.v. pulse (125 µl/100 g) at about 2½ hrs after the injection of DZP or vehicle. Nine to 12 timed arterial blood samples were drawn during the following 45 min in glass capillary tubes. The blood samples were immediately centrifuged and the plasma concentration of 2DG and glucose were determined, as previously described (56).

At approximately 45 min after the pulse of 2DG, the animals were killed by decapitation. Brains were rapidly removed and frozen in isopentane chilled to -30°C and stored at -80°C. The brains were then cut into 20-µm coronal sections at -22°C in a cryostat. Sections were autoradiographed on Kodak SB5 film along with calibrated

[^{14}C]methylmethacrylate standards calibrated for their ^{14}C concentration in brain sections (67). Adjacent sections were fixed and stained with thionin for histological identification of specific nuclei.

The autoradiographs were analyzed by quantitative densitometry with a computerized image processing system (Biocom 200, Les Ulis, France) or a manual microdensitometer (Macbeth, TD901, Kollmorgen Co., Newburgh, U.S.A.). Optical density measurements for each structure anatomically defined according to the rat brain atlas of Sherwood and Timiras (64) for immature rats were made bilaterally in a minimum of 4 brain sections. All densitometry was conducted without knowledge of the treatment of the animal. Tissue ^{14}C concentrations were determined from the optical densities of the autoradiographic representations of the tissues and a calibration curve obtained from the autoradiographs of the calibrated standards. Local rates of cerebral glucose utilization were then calculated from local tissue concentration of ^{14}C , time courses of the plasma 2DG and glucose concentrations, and appropriate constants according to the operational equation of the method (67). They were also corrected for the time lag in sampling blood through arterial catheters in small animals, as previously described (53).

Statistical analysis. For each behavioral test, the performances of the 105 animals exposed to DZP were compared with those of the 129 vehicle-treated rats by Mann-Whitney U-test and Chi-two test. LCMRglcs were determined in 12 structures of 6 groups of rats, 3 groups of vehicle- and 3 groups of DZP-exposed animals. The values of glucose utilization obtained for each structure in the vehicle group were compared to the values in the DZP group by means of Student's t-test.

RESULTS

Physical parameters. Body weight, measured daily between P2 and P21 was significantly lower ($p < 0.01$) in DZP- than in vehicle-exposed rats at all ages (Fig. 1). The appearance of hair occurred at P9 in 42% of the DZP-exposed pups vs 64% of vehicle-treated animals. The difference was statistically significant. By P10, hair had grown in more than 94% of the animals from both groups (Fig. 1). Eyelids opened at P14 in 55-58% of both DZP- and vehicle-treated rats (Fig. 1).

Neurobehavioral development of the rat pups.

Righting reflex. At P4, 95 and 97% of the animals tested were able to come back to a quadruped position within 2.4 and 1.8 sec in control and DZP-exposed groups, respectively. There was no significant difference between the two groups (Table 1).

Negative geotaxis. In this test, 98 and 95% of all P9 rats, vehicle- and DZP-exposed respectively, were successful. However, DZP-exposed pups needed a median time of 33 sec to turn up completely in the slope while vehicle-exposed rats achieved the test in 18.6 sec ($p < 0.01$) (Table 1).

Suspension time. At P10, the median time during which DZP-exposed rats were able to grasp the metal rod before falling was significantly increased by 3 sec over the value recorded in control animals (Table 1).

Locomotor coordination. In this test, 72% of P20 vehicle-exposed rats were successful vs 57% of the DZP-treated pups. The difference was statistically significant (Fig. 2a). Considering the 3 different phases of the test, the percentage of rats able to swim and to reach the pole was similar in both groups (88%) as well as the percentage of rats able to climb the pole (89-94%). However, in the third phase of the test, the percentage of rats able to land on the platform with the 4 paws was significantly reduced in the DZP group compared to control animals (72 vs 88%). Median total time to succeed in this test was 64-65 sec in both groups. The time spent for the first (37 sec) and second phase (9-10 sec) was also similar in both groups of rats (Fig. 2b). Only the time necessary to reach the platform with the 4 paws was significantly longer in DZP-exposed rats (14 sec) compared to vehicle-treated animals (7 sec) (Fig. 2b). In the latter part of the test, the percentage of the animals that did not fall off the platform (65%), or fell one (25%), two (7%) or three times (2%) was similar in both groups.

Local cerebral glucose utilization. At P10, LCMRglcs were significantly reduced (32-45%) by DZP exposure in 5 structures of the 12 studied. These were lateral geniculate nucleus, superior colliculus (Fig. 3), dorsomedian caudate (Fig. 4), red and vestibular nuclei (Fig. 5). At P14, LCMRglcs were significantly decreased (31-45%) by the pharmacological treatment in all structures studied, except globus pallidus (Fig. 4) and cerebellar cortex (Fig. 5). At P21, LCMRglcs were lower by 19-37% in the DZP- than in the vehicle-exposed group in the 3 structures of the visual system (Fig. 3) and of the motor system (Fig. 4) as well as in red and fastigial nuclei (Fig. 5).

DISCUSSION

General effects of neonatal diazepam exposure. Early BZD exposure induces a retardation in body growth. This retardation has been recorded in rodents after prenatal exposure to various BZD treatments, such as 1-10 mg/kg DZP (1, 23, 25, 51, 62, 66), 2 mg/kg lorazepam (12), 5-50 mg/kg oxazepam (2), 2.5-5.0 mg/kg midazolam (55), 10-100 mg/kg chlordiazepoxide (10, 42, 55). Body growth retardation has also been reported in rodents after postnatal exposure to BZD, i.e. 1-10 mg/kg DZP (20, 22, and the present study), 0.25-5 mg/kg lorazepam (20, 21) or 0.5 mg/kg clonazepam (71). Likewise, in human infants born from mothers using therapeutic levels of BZD during pregnancy, mean birth weight for gestational age was reduced (43, 44) and head circumference slightly decreased (44).

In most studies, many parameters of somatic development are not widely affected by early BZD exposure. In the present study, fur development is retarded as shown after exposure to 1 or 5 mg/kg DZP from gestational day 14-20 (G14-G20) (62) or 10-100 mg/kg chlordiazepoxide (CDZ) from G1-G21 (10). Usually, as in the present study, ear and eyelid opening as well as incisor eruption are not retarded by exposure to 1-5 mg/kg DZP or to 2.5-5.0 mg/kg lorazepam during gestation (5, 19, 51, 62). A delay in eyelid opening has only been reported in two studies, after exposure during gestation to high doses of either oxazepam (2) or CDZ (55).

In the present study, the absence of retardation in eyelid opening occurs in spite of the significant decrease in LCMRglc at the three levels of the visual system between P10 and P21 (Fig. 3) that is rather indicative of altered visual function than related to physical development such as eyelid opening. These data show that there is no correlation between the parameters of somatic development and a possible retardation or impairment of the function itself. Likewise, prenatal 1-10mg/kg DZP delays the acoustic startle response in P25-P28 rats (2, 5, 39, 40) while ear opening is not affected by early BZD exposure (5).

Neurobehavioral development of rat pups. As shown in the present study, the static righting reflex is not affected by 1-10 mg/kg DZP (5, 19, 23, 25, 62) or 1-20 mg/kg CDZ during gestation or lactation (1, 55). Only when the acquisition of the righting reflex is tested over a range of ages (P2-P20), control rats need shorter times than their DZP-exposed congeners to righting and meet first a perfect performance at about 1 sec (51).

Likewise, in the present study, the percentage of rats successful in pivoting by 180° on an inclined plane was not affected by neonatal DZP exposure. Similar data have been reported after prenatal exposure to DZP (62). They are in good accordance with the absence of early BZD exposure on cliff avoidance (5) and locomotion on an inclined plane at P7 (25). However, as with the righting reflex, when locomotion on an inclined plane and cliff avoidance are tested over development, BZD-exposed rats reach a good criterion at an older age than control animals (1, 25). These latter data can be related to the increase in the time necessary to complete pivoting on the inclined plane recorded in the present study in DZP- vs vehicle-treated rats.

DZP, given either prenatally (48, 51) or postnatally (the present study) increased the hanging time of the rats on a horizontal bar and the time spent on a net at P10. The increase in suspension time recorded in the present study is not related to the decrease in body weight recorded in DZP-exposed rats compared to controls and remains significant after correction of the data for animals weight. Our data are rather indicative of a less active behavior of the rat pup (48) and/or the muscle-relaxant effect induced by the BZD (48, 51). Indeed, muscle relaxant properties of BZD are related to the decrease in

functional activity they induce at the level of the reticular formation, cerebellar and vestibular nuclei (52), as recorded in the present study (Fig. 5). In human infants exposed to BZD during pregnancy, lower muscle tonus has also been recorded (43).

Finally, in the test of locomotor coordination performed at P20, DZP-exposed rats were less successful than controls (Fig. 2a,b). This difference was essentially related to the performance of the animals in the third part of the test, i.e. landing on the horizontal platform. In previous studies, as in the present one, swimming has been shown to be mostly unaffected by BZD exposure, either at P7, P17 and P29 during postnatal treatment with 0.5 mg/kg clonazepam from P7-P29 (71) or at P14 after 1 or 5 mg/kg DZP from G14-G20 (62). In one study, the normal swimming pattern was found to be altered in 1 mg/kg CDZ-exposed offspring either during gestation or lactation, but the difference disappeared after correcting for body weight (1). The lack of difference in swimming performance of rats exposed to BZD compared to controls was attributed to a lack of influence of the BZD on neuromuscular coordination controlled by the cerebellum, conversely to early exposure to other drugs, such as phenytoin, phenobarbital and dipropylacetate (16, 68, 72). Concerning the second part of the test, i.e. climbing on the metal rod, our data are in good accordance with the lack of difference between DZP-exposed and control rats concerning the balance and locomotor coordination tested on a partly horizontal, partly inclined, narrow elevated bar (25). In fact, the most obvious deficit recorded in the present study was related to the third part of the test, the successful landing on the horizontal platform. In that part of the test, rats usually failed and lost their balance when putting their hindpaws on the horizontal platform. However, even if DZP-exposed rats are able to swim and to climb the rod as fast as control animals, their motor coordination appears already to be impaired in a more subtle way in those phases. Indeed, DZP-exposed rats swim in circles instead of straight as control animals do. A similar swimming behavior has been observed after a pre- or postnatal exposure of 1 mg/kg CDZ (1). Moreover, DZP-exposed rats climb along the rod spirally and lose often contact of their forepaws with the rod while control rats climb straight and keep their forepaws in contact with the rod. However, these behavioral differences, although indicative of some motor coordination impairment, do not translate into an increased time to achieve the first two parts of the test. In fact, the impairment of locomotor coordination becomes only significant in the latter part of the test. It concerns mostly the hindpaws and the balance of the hind part of the body. Likewise, motor development is retarded in infants born from BZD-exposed mothers (43, 44) with an impairment especially in fine motor functions (44).

Correlation of neurobehavioral development with functional activity. The behavioral deficits recorded in the present study may reflect the decreases in metabolic activity in regions controlling locomotion, body balance and visual perception. Cerebellar cortex and nuclei as well as vestibular nucleus are highly interconnected and establish connections with the activatory and inhibitory reticular formation, central grey nuclei and some visual areas, such as mainly superior colliculus in order to control postural activity leading to an integrated, automatic and unconscious functioning of balance and visuo-motricity (4, 26, 29). In the present study, the depression of LCMRglcs in all these nuclei (Figs. 3 and 5) is certainly underlying the impairment recorded in the different parts, and mostly in the third part of the locomotor coordination test performed at P20. Indeed, in this part of the test, the rat has to move from a vertical metal rod to a horizontal platform, involving visuo-motricity control to reach a balanced posture on the platform. Moreover, functional activity is also decreased in other parts of the extrapyramidal motor system (Fig. 4). The decreases recorded in these anterior motor structures may also relate to the motor impairments recorded in swimming, climbing and in the control of body balance. The decreases in LCMRglcs in areas of the extrapyramidal system recorded in the present study may also reflect the increase in the time needed by the P9 rats to achieve pivoting on an inclined plane in the present study. They are also in good accordance with the decrease in locomotor activity recorded around the end of the second postnatal week after early BZD exposure (2, 11, 19, 40, 48, 65). Indeed, the second and third postnatal week appear critical for the development of locomotion in rodents (37). Therefore, there could be specific, age-related effects of neonatal administration of DZP on some specific features of motor development. Early BZD exposure also produces significant changes in GABAergic mechanisms which

modulate arousal and contribute to the control of motor responding (45). Moreover, the relative hypoactivity recorded in many studies during the second postnatal week in rodents as a result of early BZD exposure suggests alterations in the monoaminergic mechanisms that mediate locomotor activity (2, 11, 19, 40, 48, 65). Early benzodiazepine exposure induces also short- and long-term decreases in the density of BZD receptors in cortex, thalamus, hypothalamus and cerebellum that are functionally linked to GABA_A receptors (46, 47, 61). The maturation of BZD receptors starts at embryonic day 14 (E14) (8, 59) and they reach about 25% of their adult density at birth. Thus, neonatal DZP exposure overlaps a large period of BZD receptor development (14, 49). Moreover, while cerebral dopaminergic innervation starts between E14 and E17, it is only complete between P20-P60 according to the area (6, 54). Synaptogenesis occurs also relatively late in both cortical and striatal GABAergic neurons. Therefore, it is conceivable that the neonatal BZD treatment that translates into quite marked decreases in brain glucose utilization and in rather subtle neurobehavioral impairments during development may relate to changes in the final synaptic organization of brain structures and to a relative cellular imbalance between excitatory and inhibitory processes instead of an impact on the appearance of neurons containing monoamines or the GABA/BZD receptor. In that perspective, given the reported neurobehavioral impairments in human infants born from mothers exposed to therapeutic levels of BZD during pregnancy (43, 44), the potential harmful effects of exposure of the immature brain to BZD should be more widely considered.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U 272) and by a grant from the Ministère de la Recherche et de la Technologie (Toxicologie N°91C0661). The authors wish to thank the Laboratoires Roche (Basel, Switzerland and Neuilly-sur-Seine, France) for the kind gift of Valium injectable ampoules (10 mg/2 ml).

REFERENCES

1. ADAMS, P.M. 1982. Effects of perinatal chlordiazepoxide exposure on rat preweaning and postweaning behavior. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **4**: 279-282.
2. ALLEVA, E., G. LAVIOLA, E. TIRELLI, AND G. BIGNAMI. 1985. Short-, medium-, and long-term effects of prenatal oxazepam on neurobehavioral development of mice. *Psychopharmacology* **87**: 434-441.
3. ALTMAN, J., AND K. SUDARSHAN. 1975. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* **23**: 896-920.
4. BAILLET, J., AND É. NORTIER. 1992. Contrôle de la statique et de la visuo-motricité. In *Précis de Physiologie Humaine* (J. Baillet and E. Nortier, Eds.), pp. 714-726. Ellipses, Paris.
5. BARLOW, S.M., A.F. KNIGHT, AND F.M. SULLIVAN. 1979. Prevention by diazepam of adverse effects of maternal restraint stress on postnatal development and learning in the rat. *Teratology* **19**: 105-110.
6. BERGER, B., AND C. VERNEY. 1984. Development of the catecholamine innervation in rat neocortex: morphological features. In *Monoamine Innervation of Cerebral Cortex* (L. Descarries, T.R. Reader and H.H. Jasper, Eds.), pp. 95-121. Alan Liss, New York.
7. BERGMAN, U., AND M. DAHLSTRÖM. 1988. Anxiety and antianxiety drug use in Sweden. In *Workshop "Pharmacological Treatment of Anxiety"* (National Board for Health and Welfare), pp. 63-74. Drug Information Committee, Sweden.
8. BRAESTRUP, C., AND M. NIELSEN. 1978. Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the rat brain. *Brain Res.* **147**: 170-173.
9. BURDETTE, D.E., AND T.R. BROWNE. 1990. Benzodiazepines. In *Comprehensive Epileptology* (M. Dam, and L. Gram, Eds.), pp. 547-561. Raven Press, New York.
10. BUTTAR, H.S., I. DUPUIS, AND J.H. MOFFATT. 1979. Pre- and postnatal effects of chlordiazepoxide (Librium) in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **48**: A120.
11. CAGIANO, R., M.A. DE SALURA, M. PERSICHELLA, G. RENNA, M. TATTOLI, AND V. CUOMO. 1990. Behavioural changes in the offspring of rats exposed to diazepam during gestation. *Eur. J. Pharmacol.* **177**: 67-74.
12. CHESLEY, S., M. LUMPKIN, A. SCHATZKI, W.R. GALPERN, D.J. GREENBLATT, R.I. SHADER, AND L.G. MILLER. 1991. Prenatal exposure to benzodiazepine - I. Prenatal exposure to lorazepam in mice alters open-field activity and GABA_A receptor function. *Neuropharmacology* **30**: 53-58.
13. CHUGANI, H.T., M.E. PHELPS, AND J.C. MAZZIOTTA. 1987. Positron emission tomography study of human brain functional development. *Ann. Neurol.* **22**: 487-497.
14. DAVAL, J.L., M.C. WERCK, A. NEHLIG, AND A. PEREIRA DE VASCONCELOS. 1991. Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to GABA receptors in the rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* **9**: 307-320.
15. DESOR D. 1979. Application d'une batterie de tests du développement moteur et d'une méthode de conditionnement d'évitement à la lumière à l'étude des effets de la diphénylhydantoïne chez le rat. *Thèse de Doctorat de 3ème Cycle de l'Université de Nancy I*, France.
16. DIAZ, J., AND W.D. SHIELDS. 1981. Effects of dipropylacetate on brain development. *Ann. Neurol.* **10**: 465-468.
17. DOBBING, J. 1968. Undernutrition and the developing brain. In *Developmental Neurobiology* (W.A. Himwich, Ed.), pp. 241-261. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
18. FARREL, K. 1986. Benzodiazepines in the treatment of children with epilepsy. *Epilepsia* **27**, **Suppl 1**: S45-S51.
19. FELINSKA, W., U. PYKA, R. SZKYLNIK, K. CZECHOWICZ, E. SIEKIERSKA, U. PILSNIAK, AND R. BRUS. 1989. Effect of ethanol and diazepam given to pregnant rats on the behavior and catecholamine content in the brain of offspring. *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* **41**: 223-225.

20. FILE, S.E. 1986. Effects of neonatal administration of diazepam and lorazepam on performance of adolescent rats in tests of anxiety, aggressive behavior, learning and convulsions. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **8**: 301-306.
21. FILE, S.E. 1986. The effects of neonatal administration of lorazepam on passive avoidance and on social, aggressive and exploratory behavior of adolescent male rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **8**: 447-452.
22. FILE, S.E. 1987. Diazepam and caffeine administration during the first week of life: changes in neonatal and adolescent behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* **9**: 9-16.
23. FRIEDER, B., S. EPSTEIN, AND V.E. GRIMM. 1984. The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups. *Psychopharmacology* **83**: 51-55.
24. FRIEDER, B. AND V.E. GRIMM. 1985. Some lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam. *J. Neurochem.* **45**: 37-42.
25. GAI, N., AND V.E. GRIMM. 1982. The effect of prenatal exposure to diazepam on aspects of postnatal development and behavior in rats. *Psychopharmacology* **78**: 225-229.
26. GAUTHIER, G., J.L. VERCHER, G. OBRECHT, AND J.L. SEMMLOW. 1994. L'adaptation aux verres correcteurs. *La Recherche* **25**: 294-302.
27. GELLY, J.L. 1978. Effet d'une sous-alimentation quantitative sur la rate et ses jeunes. Etude du développement sensorimoteur à l'aide d'une batterie cohérente de tests. *Thèse de Doctorat de 3ème Cycle de l'Université de Nancy I, France.*
28. GRUEN, R.J., J.D. ELSWORTH, AND R.H. ROTH. 1990. Regionally specific alterations in the low-affinity GABA_A receptor following perinatal exposure to diazepam. *Brain Res.* **514**: 151-154.
29. GUYTON, A.C. 1989. *Anatomie et Physiologie du Système Nerveux.* Vigot, Paris.
30. HAEFELY, W. 1985. Tranquilizers. In *Pharmacology 2, Part 1: Preclinical Psychopharmacology* (D.G. Grahame-Smith, Ed.), pp. 92-182. Elsevier, Amsterdam.
31. HANNAH, R.S., A.W. SPIRA, AND S.H. ROTH. 1989. The effects of two anticonvulsants on amino acid levels in the developing rat cerebellum. *Neurochem. Res.* **14**: 427-429.
32. HARVEY, S.G. 1985. Hypnotics and sedatives. In *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* (A. Gilman, L. Goodman, T. Rall, and F. Murad, Eds.), pp. 339-371. MacMillan, New York.
33. HEINONEN, O.P., D. SLONE, AND S. SHAPIRO. 1977. *Birth Defects and Drugs in Pregnancy.* PSG Publishers, Littleton.
34. JAFFE, J.H. 1985. Drug addiction and drug abuse. In *Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics* (A. Gilman, L. Goodman, T. Rall, and F. Murad, Eds.), pp. 532-581. MacMillan, New York.
35. KANEKO, S. 1991. Antiepileptic drug therapy and reproductive consequences: functional and morphological aspects. *Reprod. Toxicol.* **5**: 179-198.
36. KANTO, J.H. 1980. use of benzodiazepines during pregnancy, labour and lactation, with particular reference to pharmacokinetic considerations. *Drugs* **23**: 354-380.
37. KELLEY, A.G., M. CADOR, AND L. STINUS. 1989. Exploration and its measurement. In *Neuromethods, Vol. 13* (A.A. Boulton, G.B. Baker and A.J. Greenshaw, Eds.), pp. 95-143. Clifton, New Jersey.
38. KELLOGG, C.K. 1988. Benzodiazepines: influence on the developing brain. In *Progress in Brain Research, Vol. 73* (G.J. Boer, M.G.P. Feenstra, M. Mirmiran, D.F. Schwaab and F. Van Haaren, Eds.), pp. 207-228. Elsevier, Amsterdam.
39. KELLOGG, C., J.R. ISON, AND R.K. MILLER. 1983. Prenatal diazepam exposure: effects on auditory temporal resolution in rats. *Psychopharmacology* **79**: 332-337.
40. KELLOGG, C., D. TERVO, J. ISON, T. PARISI, AND R.K. MILLER. 1980. Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. *Science* **207**: 205-207.

41. KENNEDY, C., J.D. GRAVE, J.W. JEHLE, AND L. SOKOLOFF. 1972. Changes in blood flow in the component structures of the dog brain during postnatal maturation. *J. Neurochem.* **19**: 2423-2433.
42. KURINSHINGAL, H., P. PALANZA, AND P.F. BRAIN. Effects of exposure of pregnant mice to chlordiazepoxide (CDP) on the development and ultrasound production in their offspring. *Gen. Pharmacol.* **23**: 49-53.
43. LAEGREID, L., G. HAGBERG, AND A. LUNDBERG. 1992. The effect of benzodiazepines on the fetus and the newborn. *Neuropediatrics* **23**: 18-23.
44. LAEGREID, L., G. HAGBERG, AND A. LUNDBERG. 1992. Neurodevelopment in late infancy after prenatal exposure to benzodiazepines - A prospective study. *Neuropediatrics* **23**: 60-67.
45. LAVIOLA, G., F. CHIAROTTI, AND E. ALLEVA. 1992. Development of GABAergic modulation of mouse locomotor activity and pain sensitivity after prenatal benzodiazepine exposure. *Neurotoxicol. Teratol.* **14**: 1-5.
46. LIVEZEY, G.T., T.J. MARCZYNSKI, AND L. ISAAC. 1986. Enduring effects of prenatal diazepam on the behavior, EEG, and brain receptors of the adult cat progeny. *Neurotoxicology* **7**: 319-334.
47. LIVEZEY, G.T., T.J. MARCZYNSKI, AND L. ISAAC. 1986. Prenatal diazepam: chronic anxiety and deficits in brain receptors in mature rat progeny. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **8**: 425-432.
48. LYUBIMOV, B.I., N.M. SMOL'NIKOVA, AND S.N. STREKALOVA. 1974. Effect of diazepam on development of the offspring. *Bull. Exp. Biol. Med.* **78**: 1156-1158.
49. MALLORGA, P., M. HAMBURG, J.F. TALLMAN, AND D.W. GALLAGER. 1980. Ontogenetic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacology* **19**: 405-408.
50. MARCUCCI, F., E. MUSSINI, L. AIROLDI, A. GUAITANI, AND S. GARATTINI. 1973. Diazepam metabolism and anticonvulsant activity in newborn animals. *Biochem. Pharmacol.* **22**: 3051-3059.
51. MYSLIVECEK, J., J. HASSMANNOVA, AND M. JOSIFKO. 1991. Impact of prenatal low-dose diazepam or chlorpromazine on reflex and motor development and inhibitory-learning. *Homeostasis* **33**: 77-88.
52. NAKAMURA, T., H. ONO, H. FUKUDA, M. TANABE, M. KOZUKA, AND N. IWATA. 1993. Local cerebral glucose utilization in rats with decerebrate rigidity and effects of centrally acting muscle relaxants, diazepam and tizanidine. *Biol. Pharm. Bull.* **16**: 33-35.
53. NEHLIG, A., A. PEREIRA DE VASCONCELOS, AND S. BOYET. 1988. Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J. Neurosci.* **8**: 2321-2333.
54. OLSON, L., A. SEIGER, AND K. FUXE. 1972. Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation: highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res.* **44**: 283-288.
55. PANKAJ, V., AND P.F. BRAIN. 1991. Effects of prenatal exposure to benzodiazepine-related drugs on early development and adult social behaviour in swiss mice. I. Agonists. *Gen. Pharmacol.* **22**: 33-41.
56. PEREIRA DE VASCONCELOS, A., S. BOYET, AND A. NEHLIG. 1990. Consequences of an early chronic phenobarbital treatment on postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in the rat. *Dev. Brain Res.* **53**: 168-178.
57. QUERA-SALVA, M.A., A. ORLUC, F. GOLDENBERG, AND C. GUILLEMINAULT. 1991. Insomnia and the use of hypnotics: study of a French population. *Sleep* **14**: 386-391.
58. RANSOM, B.R., AND J.G. ELMORE. 1991. Effects of antiepileptic drugs on the developing central nervous system. In *Advances in Neurology*, Vol. **55** (D. Smith, D. Treiman and M. Trimble, Eds.), pp. 225-237. Raven Press, New York.
59. REGAN, J.W., W.R. ROSEKE, AND H.I. YAMAMURA. 1980. The benzodiazepine receptor: its development and its modulation by γ -aminobutyric acid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **212**: 137-143.

60. ROMIJN, H.J., M.A. HOFMAN, AND A. GRAMSBEGEN. 1991. At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term human newborn baby? *Early Hum. Dev.* **26**: 61-68.
61. ROTHE, T., AND V. BIGL. 1989. The ontogeny of benzodiazepine receptors in selected regions of the rat brain: effect of perinatal exposure to diazepam. *Neuropharmacology* **28**: 503-508.
62. RYAN, C.L., AND B.A. PAPPAS. 1986. Intrauterine diazepam exposure: effects on physical and neurobehavioral development in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **8**: 279-286.
63. SCHROEDER, H., A. COLLIGNON, L. UTTSCHIED, A. PEREIRA DE VASCONCELOS, AND A. NEHLIG. 1994. Effects of early chronic diazepam treatment on incorporation of glucose and β -hydroxybutyrate into cerebral amino acids: relation to undernutrition. *Int. J. Dev. Neurosci.* in press.
64. SHERWOOD, N.M., AND P.S. TIMIRAS. 1970. *A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain*. University of California Press, Berkeley.
65. SHORE, C.O., C.V. VORHEES, R.L. BORNSCHIEIN, AND K. STEMMER. 1983. Behavioral consequences of prenatal diazepam exposure in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* **5**: 565-570.
66. SIMMONS, R.D., R.K. MILLER, AND C.C. KELLOGG. 1981. Prenatal diazepam: Distribution and metabolism in perinatal rats. *Teratology* **23**: 62A.
67. SOKOLOFF, L., M. REIVICH, C. KENNEDY, M.H. DESROSIERS, C.S. PATLAK, K.D. PETTIGREW, O. SAKURADA, AND M. SHINOHARA. 1977. The [14 C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* **27**: 897-916.
68. THOMPSON, P.J.J., AND M.R. TRIMBLE. 1983. Anticonvulsant serum levels: relationship to impairments of cognitive functioning. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **46**: 227-233.
69. TUCKER, J.C. 1985. Benzodiazepines and the developing rat: a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **9**: 101-111.
70. VERT P., AND L. STERN. 1985. *Médecine Néonatale*. Masson, Paris.
71. WANG, L.I., AND Z. HUANG. 1990. Effect of clonazepam on brain development of mice. *Dev. Pharmacol. Ther.* **15**: 21-25.
72. YANAI, J., L. ROSSELINI-AUSTIN, AND B. TABAKOFF. 1979. Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* **64**: 237-244.

LEGENDS OF FIGURES

Figure 1: Effects of early postnatal diazepam exposure on body weight (upper part of the panel), appearance of hair (middle part of the panel) and eyelid opening (lower part of the panel).

Abbreviations: veh: vehicle, dzp: diazepam

** $p < 0.01$, statistically significant difference between dzp- and veh-exposed rats (Chi-two).

Body weight was statistically significantly lower in dzp- than in veh-treated rats at all ages ($p < 0.01$, Student's t-test).

Figure 2: Effects of early postnatal diazepam exposure on locomotor coordination. The upper part of the panel (a) represents the percentage of rats successful in the whole test (left columns) or in the different parts of the test (right columns). The lower part of the panel (b) represents the time necessary to perform the whole part of the test (left columns) or the different parts of the test (right columns).

Abbreviations: veh: vehicle, dzp: diazepam

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between dzp- and veh-exposed rats (Chi-two).

Figure 3: Effects of early postnatal diazepam exposure on glucose utilization in the different parts of the visual system.

Abbreviations: veh: vehicle, dzp: diazepam, VISCX: visual cortex, LGEN: lateral geniculate nucleus, SCOL: superior colliculus.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between dzp- and veh-exposed rats (Student's t-test).

Figure 4: Effects of early postnatal diazepam exposure on glucose utilization in the different parts of the motor system.

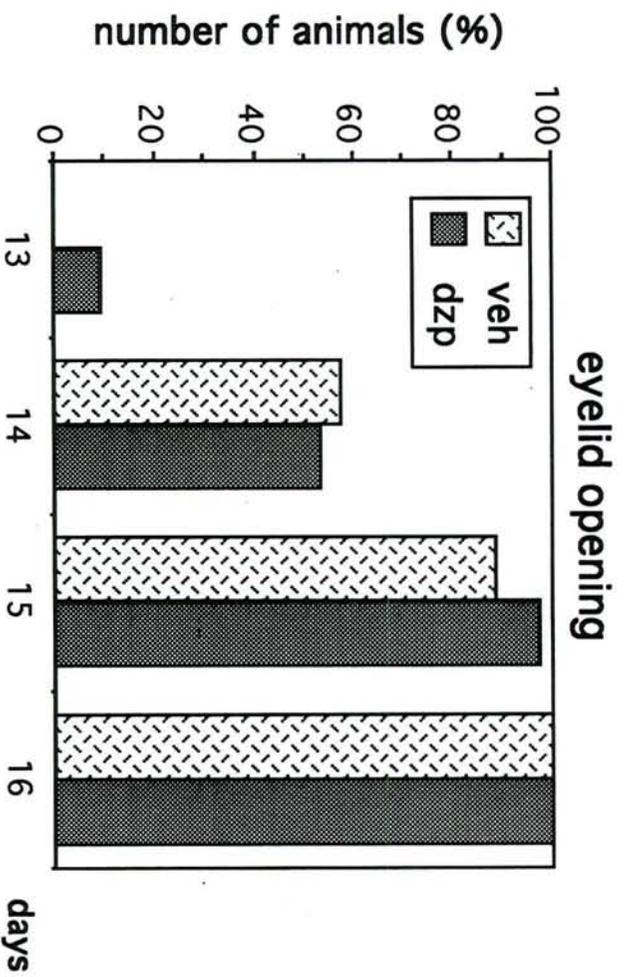
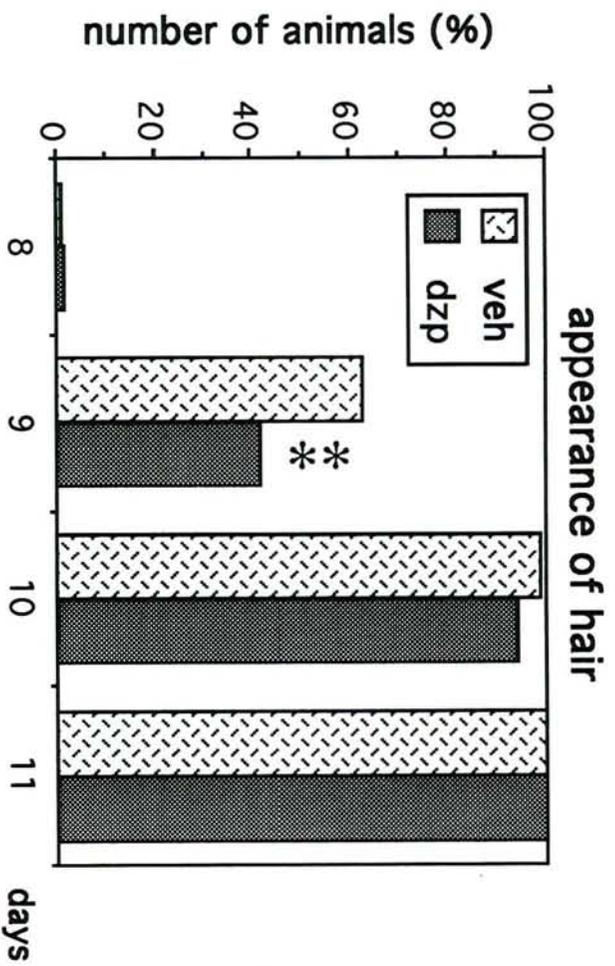
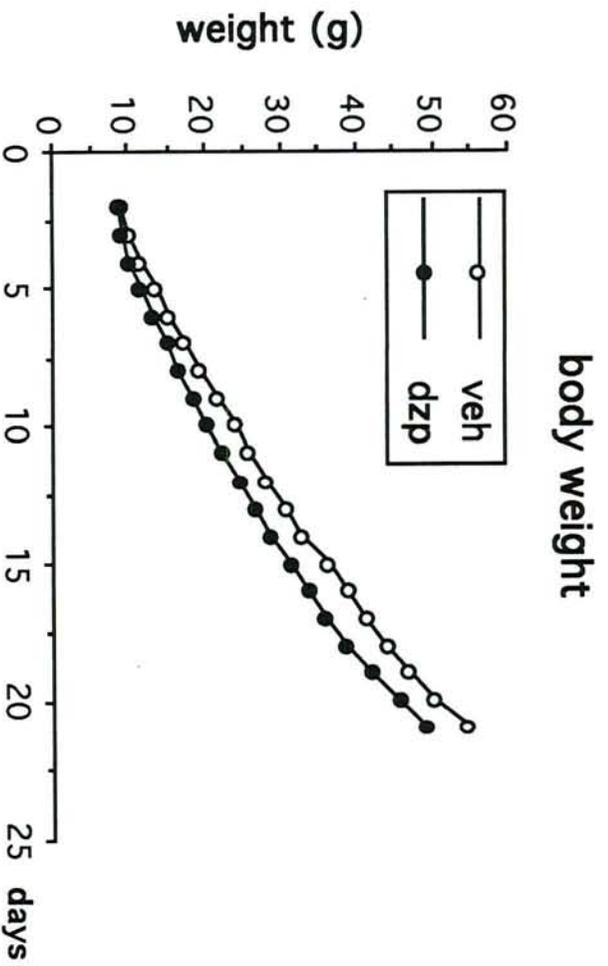
Abbreviations: veh: vehicle, dzp: diazepam, DMCAU: dorsomedian caudate nucleus, GLPAL: globus pallidus, MDTHAL: mediodorsal thalamus.

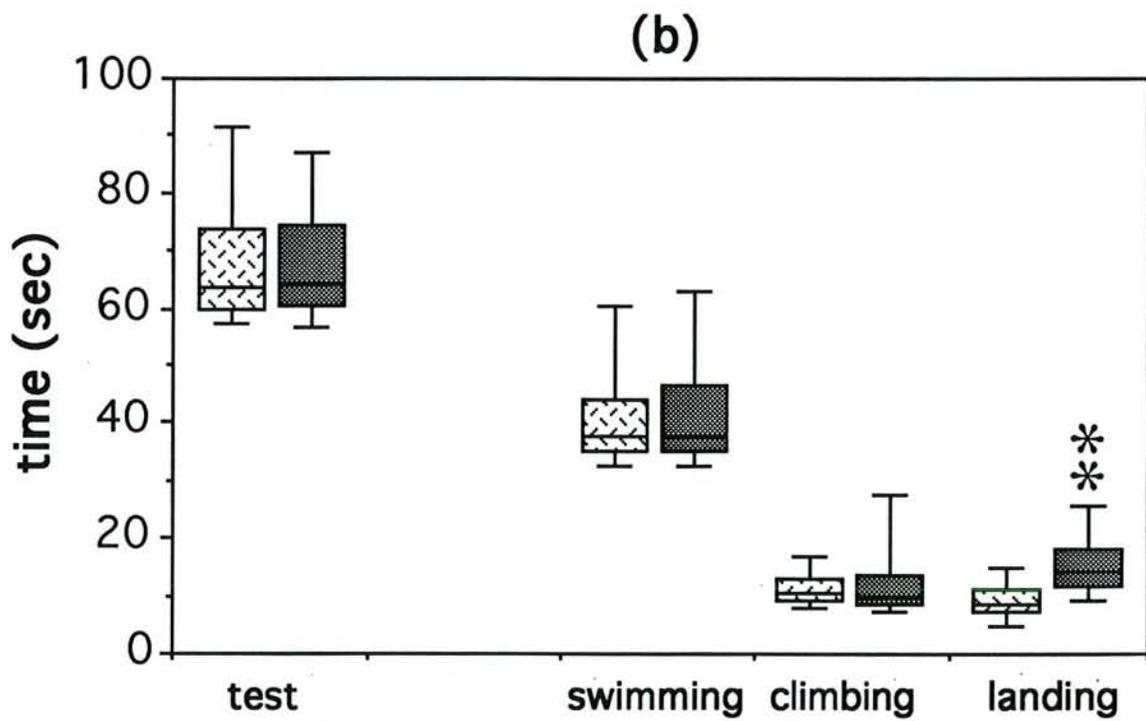
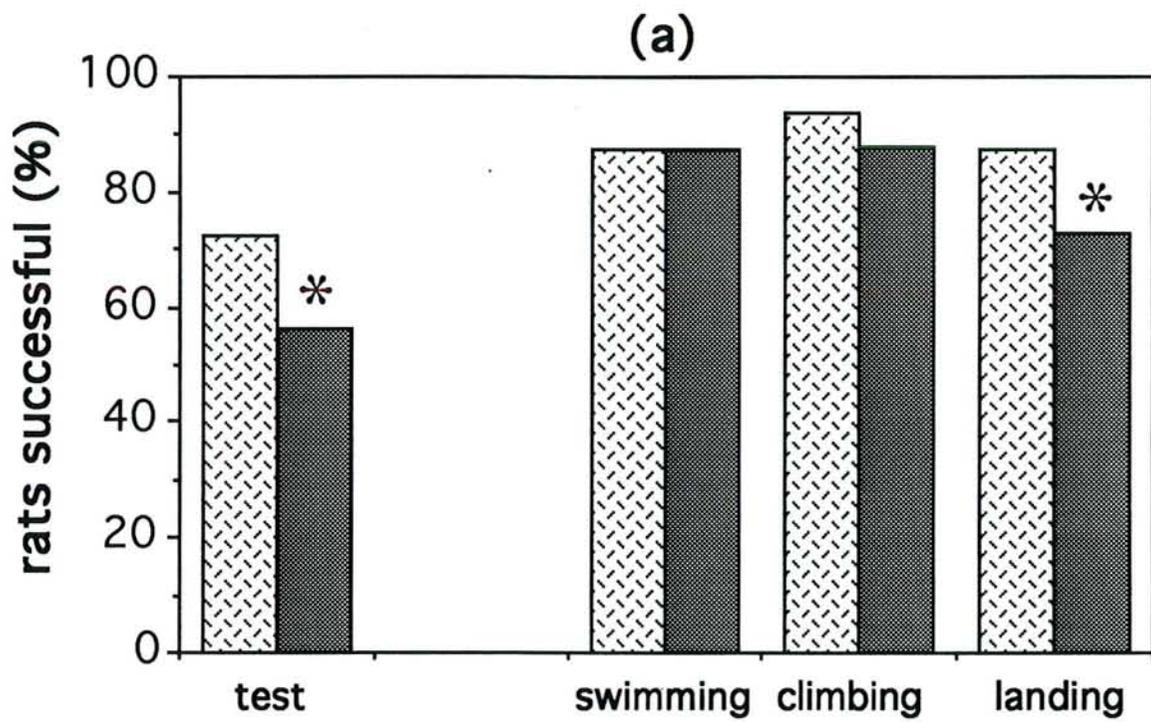
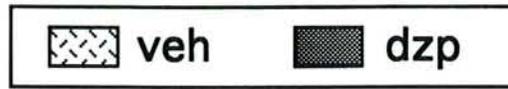
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between dzp- and veh-exposed rats (Student's t-test).

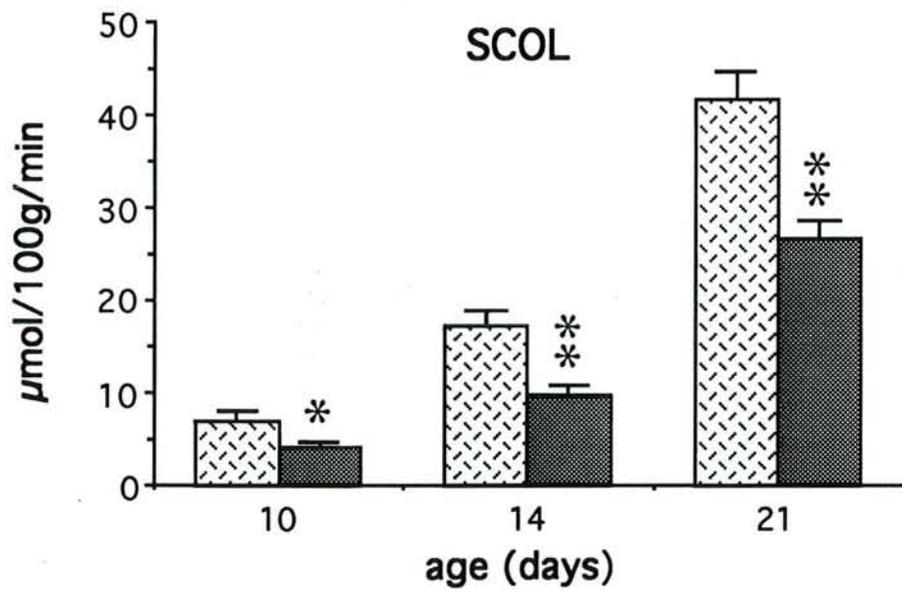
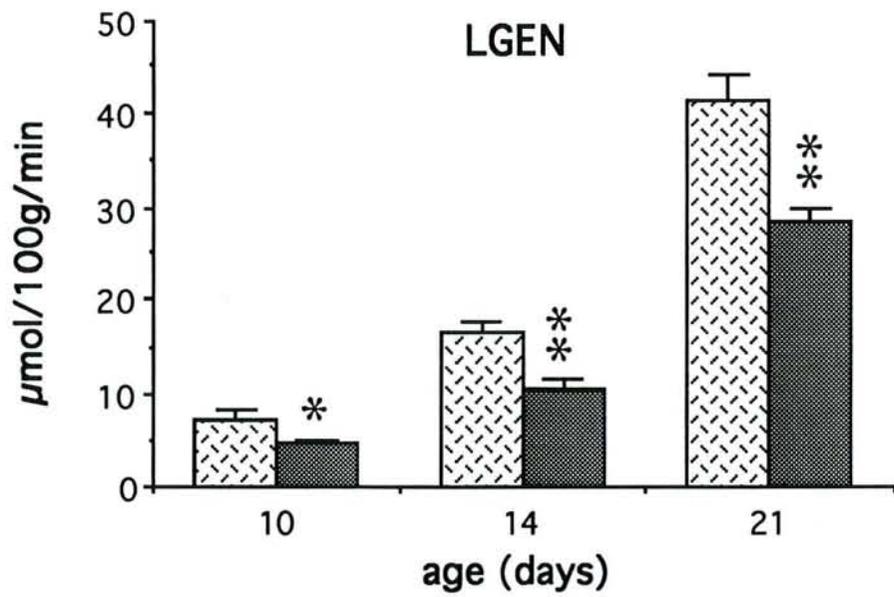
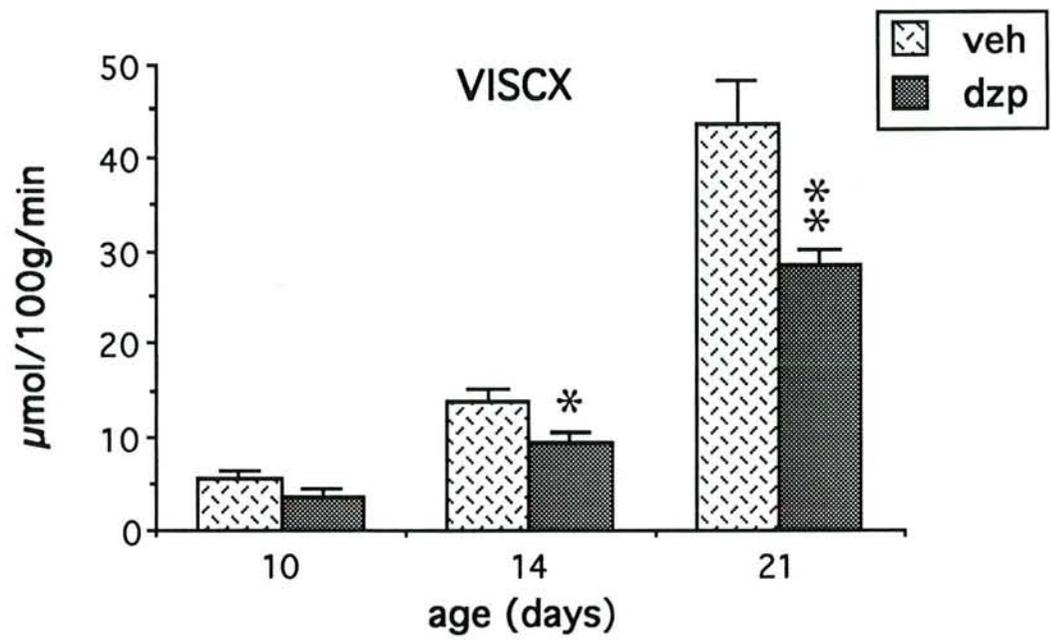
Figure 5: Effects of early postnatal diazepam exposure on glucose utilization in the different parts of the brainstem.

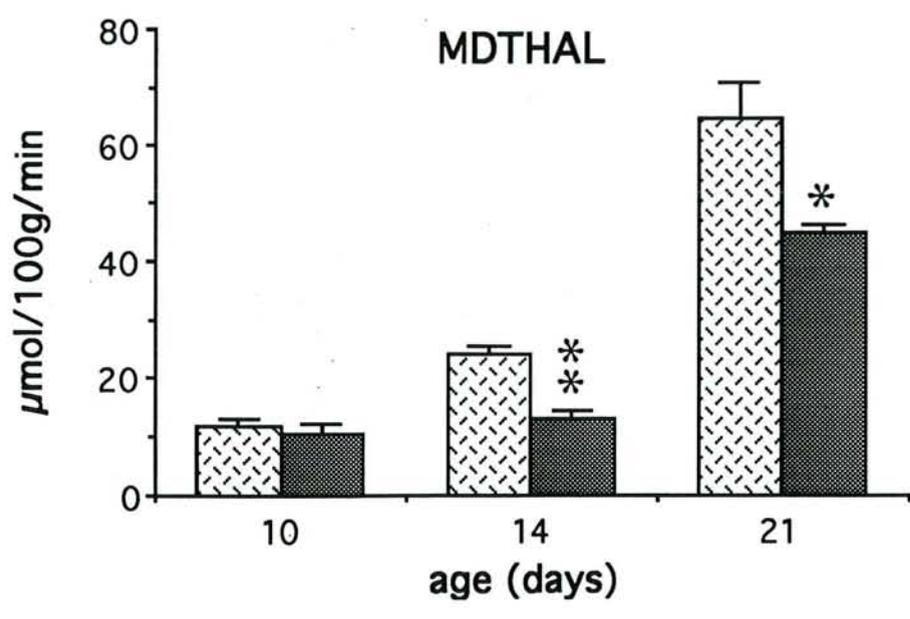
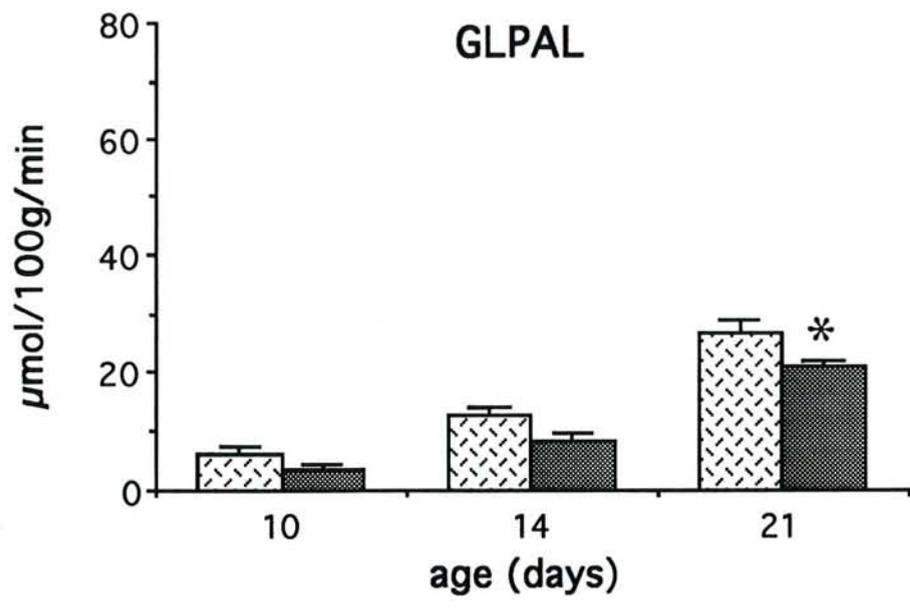
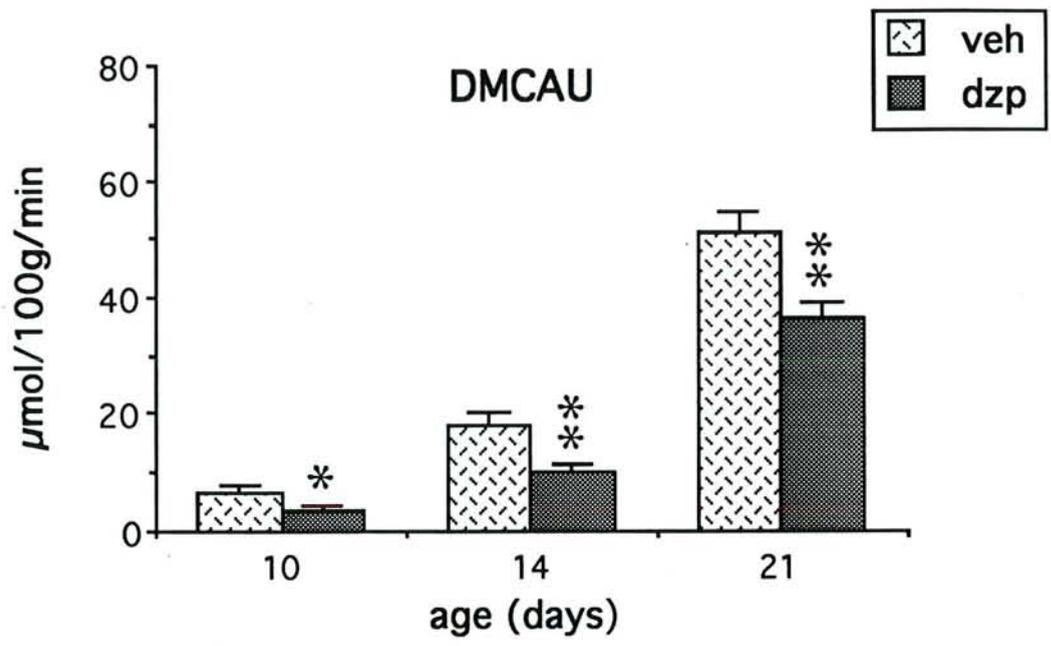
Abbreviations: veh: vehicle, dzp: diazepam, CBCX: cerebellar cortex, DENT: dentate nucleus, RN: red nucleus, FAST: fastigial nucleus, VEST: vestibular nucleus, MRF: mesencephalic reticular formation.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences between dzp- and veh-exposed rats (Student's t-test).









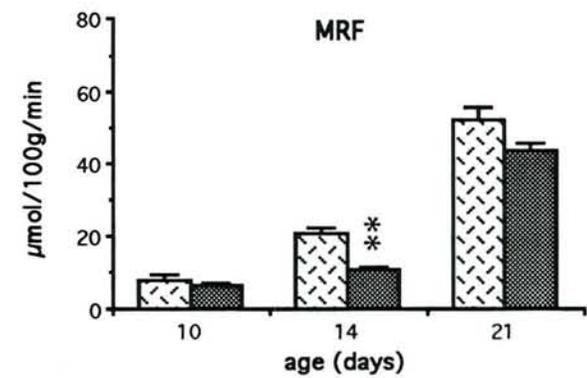
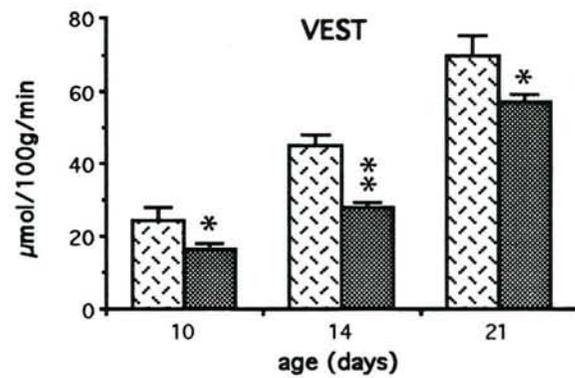
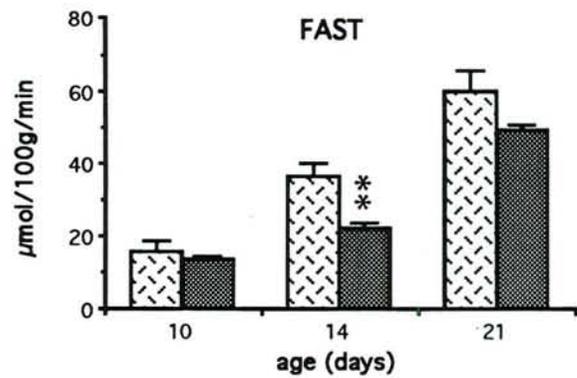
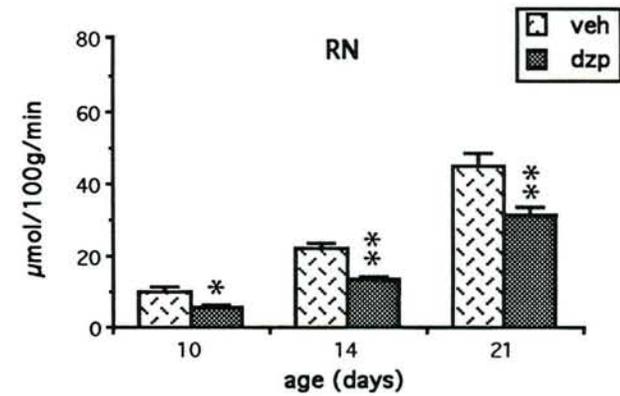
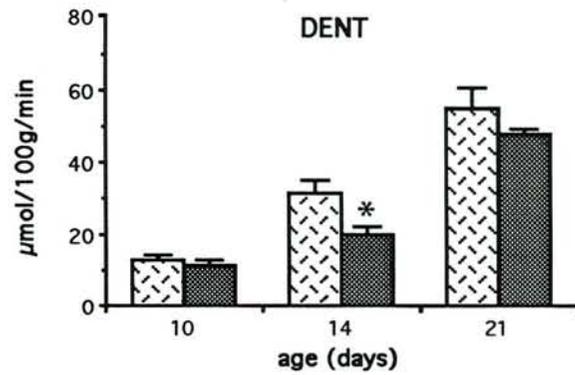
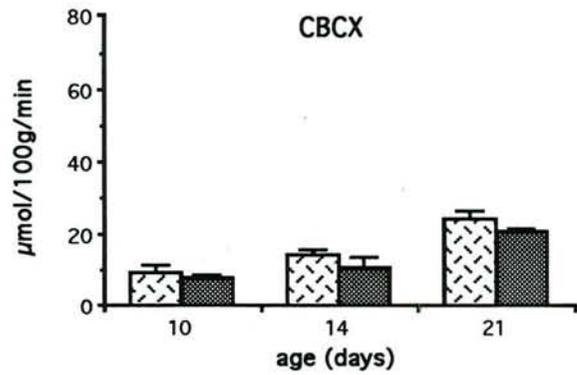


Table 1. Effects of postnatal exposure of diazepam on neurobehavioural development of rat pups

Behavioral test	age (days)		vehicle	diazepam (10 mg/kg/day)	Significance
Righting reflex	4	success (%)	94.6	97.2	n.s.
		time (sec)	2.4 (1.8-3.6)	1.8 (1.2-3.0)	n.s.
Negative geotaxis	9	success (%)	98.4	95.2	n.s.
		time (sec)	18.6 (11.0-29.9)	33.0 (19.5-54.0)	**
Suspension time	10	time (sec)	14.4 (9.6-21.6)	17.4 (12.6-24.2)	*

Values are percent of animals successful or medians, expressed in seconds, with ranges in parentheses.
 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, statistically significant differences from vehicle-treated animals.
 (two tailed Mann Withney 'U' test)

7. EFFETS DU DIAZEPAM SUR LE COMPORTEMENT D'EXPLORATION, D'ANXIÉTÉ, D'APPRENTISSAGE ET DE MEMORISATION CHEZ L'ANIMAL ADULTE.

Les effets comportementaux des différentes BZD, qu'elles soient utilisées en traitement aigu ou chronique, ont été largement étudiés depuis leur introduction sur le marché dans les années 60. Cependant, alors que la neurobiologie des comportements consiste en la recherche des structures nerveuses ainsi que des mécanismes qui permettent l'élaboration d'un comportement ou qui le sous-tendent (Calvino et coll., 1991), relativement peu de travaux ont étudié à la fois les effets de ces molécules sur l'activité fonctionnelle cérébrale et le comportement des individus, à l'exception du rôle de l'amygdale dans les phénomènes d'anxiété.

Après l'étude des variations des taux d'UCLG chez des animaux adultes exposés à un traitement chronique au DZ au cours des 3 premières semaines de vie postnatale (Schroeder et coll., 1994b), il semblait intéressant d'évaluer les effets de ce traitement sur le comportement de ces animaux et de voir si les perturbations métaboliques enregistrées dans différentes régions du cerveau sont corrélées ou non à d'éventuelles modifications comportementales.

Le but des tests qui ont été effectués n'est pas de vérifier les propriétés pharmacologiques des BZD mais d'évaluer le risque toxique à long terme de ces molécules lorsqu'elles sont administrées à un organisme au cours de son développement

Cinq tests différents ont été ainsi pratiqués chez des rats adultes dans le but d'étudier les effets à long terme du DZ sur divers aspects comportementaux du rat tels que l'exploration, l'orientation dans l'espace, l'apprentissage et la mémoire, l'anxiété et le comportement social. Il s'agit des tests du labyrinthe en T, du labyrinthe à 8 branches ou test de Olton, du labyrinthe en croix surélevée, de la boîte à 2 compartiments et d'un test social réalisé en situation de contrainte d'accès à la nourriture ou test dit "de la piscine".

7.1. Exploration en labyrinthe et mémoire spatiale

7.1.1. Anatomie de la mémoire

Par des modèles lésionnels ou des méthodes électrophysiologiques, l'étude de la mémoire spatiale dans des labyrinthes du type labyrinthe en T ou labyrinthe à 8 branches a permis de préciser le rôle de certaines structures dans les processus de mémorisation et de contribuer à l'établissement d'une anatomie de la mémoire.

Ainsi, ces études ont confirmés le rôle de l'hippocampe dans la mémoire en tant que centre d'intégration et de comparaison des informations cognitives provenant des différentes

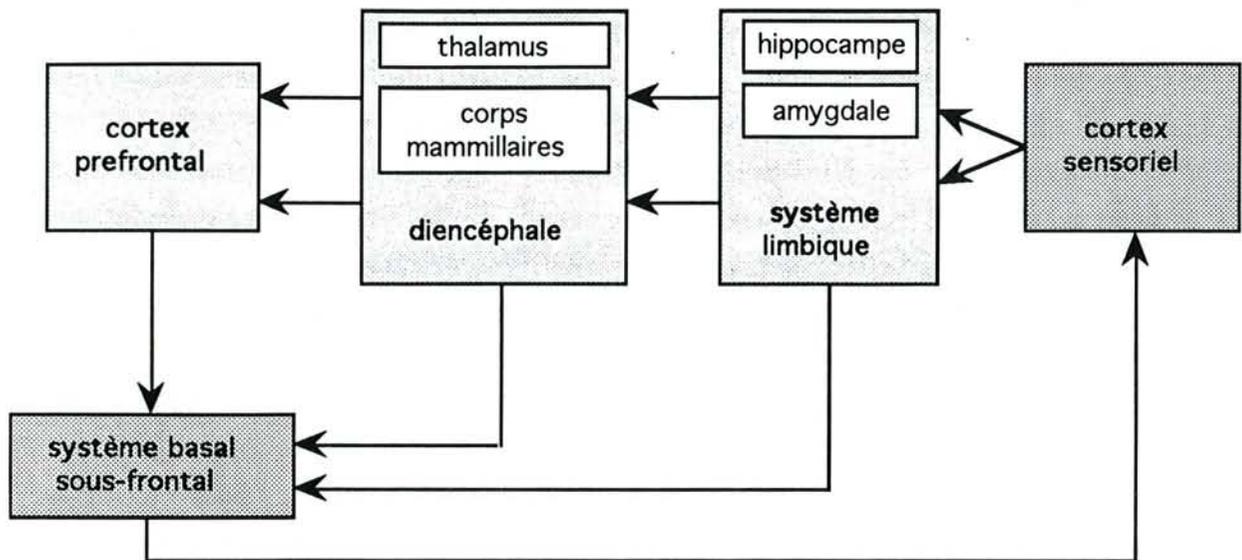


figure 19 : Représentation schématique des interactions entre les différentes structures cérébrales qui forment la mémoire. Une perception, formée dans l'aire corticale d'un système sensoriel active deux circuits parallèles. L'un des circuits a son origine dans l'amygdale, l'autre dans l'hippocampe ; les deux circuits passent par le diencéphale puis le cortex préfrontal. Chaque structure enverrait des signaux vers le cerveau antérieur inférieur qui, par ses nombreuses connexions avec le cortex, pourrait alors activer les neurones des aires corticales sensorielles, de telle sorte que la perception serait stockée sous forme de souvenirs dans la région du cortex où elle est initialement intégrée (d'après Miskin et Appenzeller, 1987).

afférences sensorielles et non comme lieu de stockage de l'information. De plus, il est apparu que, si l'hippocampe semble particulièrement important pour l'apprentissage des relations spatiales, son rôle dans d'autres formes d'apprentissage comme la reconnaissance d'un objet est moins prédominant (Miskin et Appenzeller, 1987).

L'étude d'autres aspects de la mémoire comme la reconnaissance des formes a ainsi permis d'établir, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, le rôle d'autres structures que l'hippocampe dans les processus mnésiques ainsi qu'une base anatomique de la mémoire (Duyckaerts et coll., 1991 ; Miskin et Appenzeller, 1987)

L'architecture cérébrale de la mémoire est basée d'une part, sur l'existence de 2 circuits parallèles, le circuit de Papez, hippocampo-mammillo-thalamique, et le circuit amygdalo-thalamo-frontal, qui mettent en jeu les structures limbiques du lobe temporal (hippocampe et amygdale), les régions médianes du diencéphale (thalamus et corps mammillaires) et la partie ventromédiane du cortex préfrontal, et d'autre part, sur les connexions qui s'établissent entre ces structures, le striatum et de nombreuses aires corticales (Gerfen, 1992 ; *figure 19*).

Les 2 circuits précédemment décrits ne sont en aucun cas des lieux de stockage de l'information, les lésions hippocampiques n'induisant chez l'homme ou chez l'animal aucune amnésie rétrograde mais des déficits de l'acquisition de nouveaux souvenirs. L'information ainsi acquise est sans aucun doute stockée au niveau du néocortex, les sites les plus probables de stockage de la mémoire étant les aires corticales où s'élaborent les impressions sensorielles.

Enfin, il est intéressant de noter le rôle important que pourrait jouer l'amygdale, du fait de ses nombreuses connexions avec les différents systèmes sensoriels corticaux et l'hypothalamus, dans l'association des souvenirs acquis par les différents sens et l'attribution d'un contenu émotionnel aux événements sensoriels (Ledoux, 1992 ; Miskin et Appenzeller, 1987 ; *figure 23*).

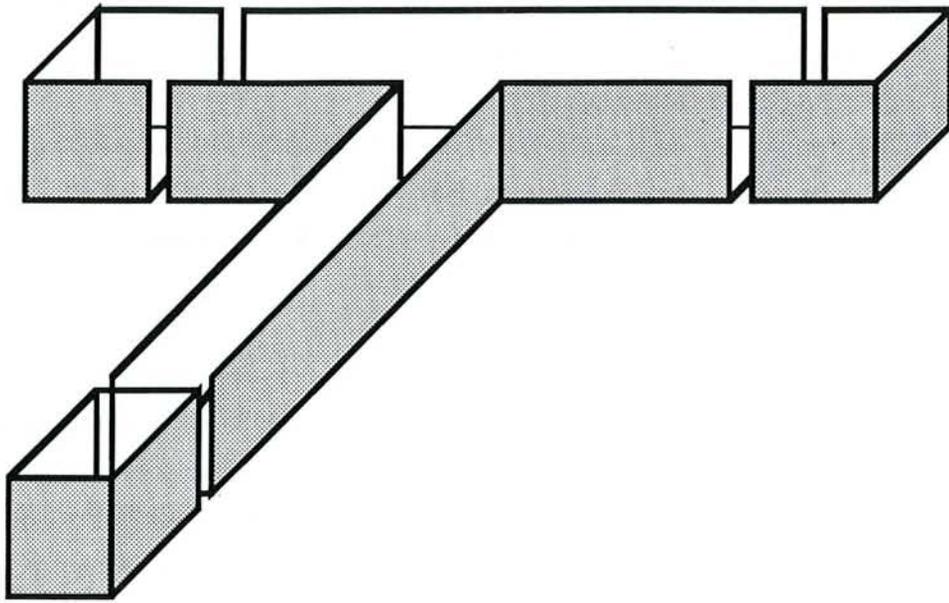
7.1.2. Labyrinthe en T

a) principe

Le comportement d'alternance spontanée est une tendance naturelle qu'ont les animaux de nombreuses espèces, et notamment le rat, à répondre de manière alternative à des choix identiques et répétés. Ainsi, des rats témoins placés dans un labyrinthe en T tendent à explorer alternativement les 2 branches du labyrinthe lors d'essais successifs et ce, en l'absence de tout conditionnement (Douglas, 1966 ; Isaacson, 1982 ; Montgomery, 1952).

La performance des animaux dans ce test est directement reliée à l'intégrité de l'hippocampe. En effet, des lésions de l'hippocampe perturbent ce comportement en réduisant le taux d'alternance (Isaacson, 1982 ; Roberts et coll., 1962).

(a)



(b)

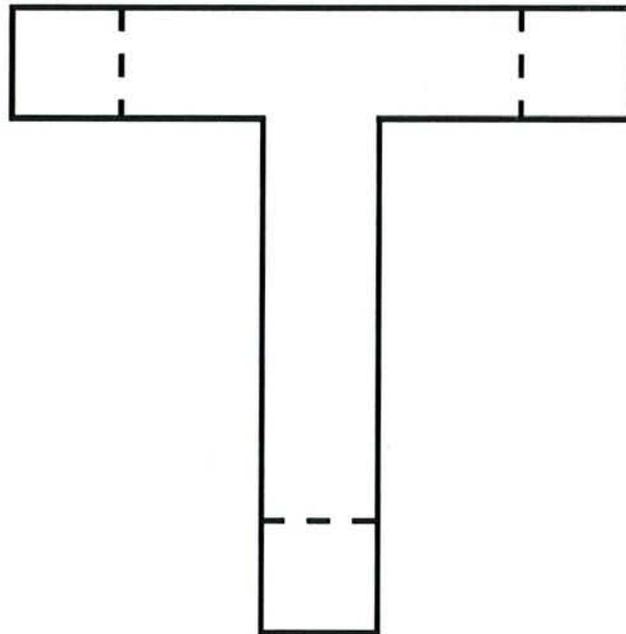


figure 20 :
Vues en trois dimensions (a) et du dessus (b) du labyrinthe en T utilisé dans le test d'alternance spontanée

Cependant, lorsque le test est répété ou si un renforcement est ajouté pour un choix correct, les déficits d'alternance qui sont observés chez des rats ayant subi des lésions de l'hippocampe disparaissent (Douglas, 1975 ; Isseroff, 1979 ; Kimble, 1976 ; Jackson et Strong, 1969).

Isseroff (1979) suggère que le déficit d'alternance observé chez des rats dont l'hippocampe est lésé, serait dû à des perturbations de la mémoire, et plutôt de la mémoire à court terme, qu'à des modifications des mécanismes sous-jacents à l'expression de ce comportement. En effet, l'introduction d'un délai entre les 2 essais dans le labyrinthe induit, chez des rats témoins, un déficit d'alternance caractéristique d'un dysfonctionnement de la mémoire (Pinsker et French, 1967). D'autre part, Isseroff (1979) constate une réduction du taux d'alternance après lésion de l'hippocampe lorsqu'un délai supérieur à 15 secondes est imposé entre les 2 essais alors que ces animaux ne présentent aucun déficit dans un test d'alternance sans délai.

Cependant, une autre hypothèse suggère que le déficit d'alternance qui est observé dans ce labyrinthe pourrait être la conséquence, en l'absence de tout renforcement, d'un manque de motivation et non d'un problème de mémoire (Douglas, 1975).

Par ailleurs, l'administration de PhB pendant les premières semaines de vie postnatale, perturbe également le comportement d'alternance observé chez des rats adultes que le test soit pratiqué avec ou sans délai (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990b). Or, il a été démontré que les cellules granulaires de l'hippocampe, qui se forment après la naissance chez les rongeurs, sont très sensibles au PhB tant sur le plan morphologique (Yanai et Bergman, 1981) que fonctionnel (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a). Ces résultats confirment ainsi le rôle important que joue l'hippocampe, et plus particulièrement les cellules granulaires du gyrus denté, dans différents processus mnésiques. Ils confirment également les travaux de Bayer et coll. (1973) qui ont observé des modifications du comportement dans un labyrinthe en T similaire à celles décrites précédemment chez des animaux où la prolifération de la couche granulaire de l'hippocampe a été inhibée.

b) protocole

Le test est réalisé dans un labyrinthe en T en bois blanc avec des parois de 15 cm de haut, constitué d'un compartiment de départ (18 x 15 cm), d'une allée commune (35 x 15 cm) et de 2 branches (20 x 15 cm) qui comportent à leur extrémité un compartiment (18 x 15 cm) qui peut être fermé par une porte guillotine (*figure 20*).

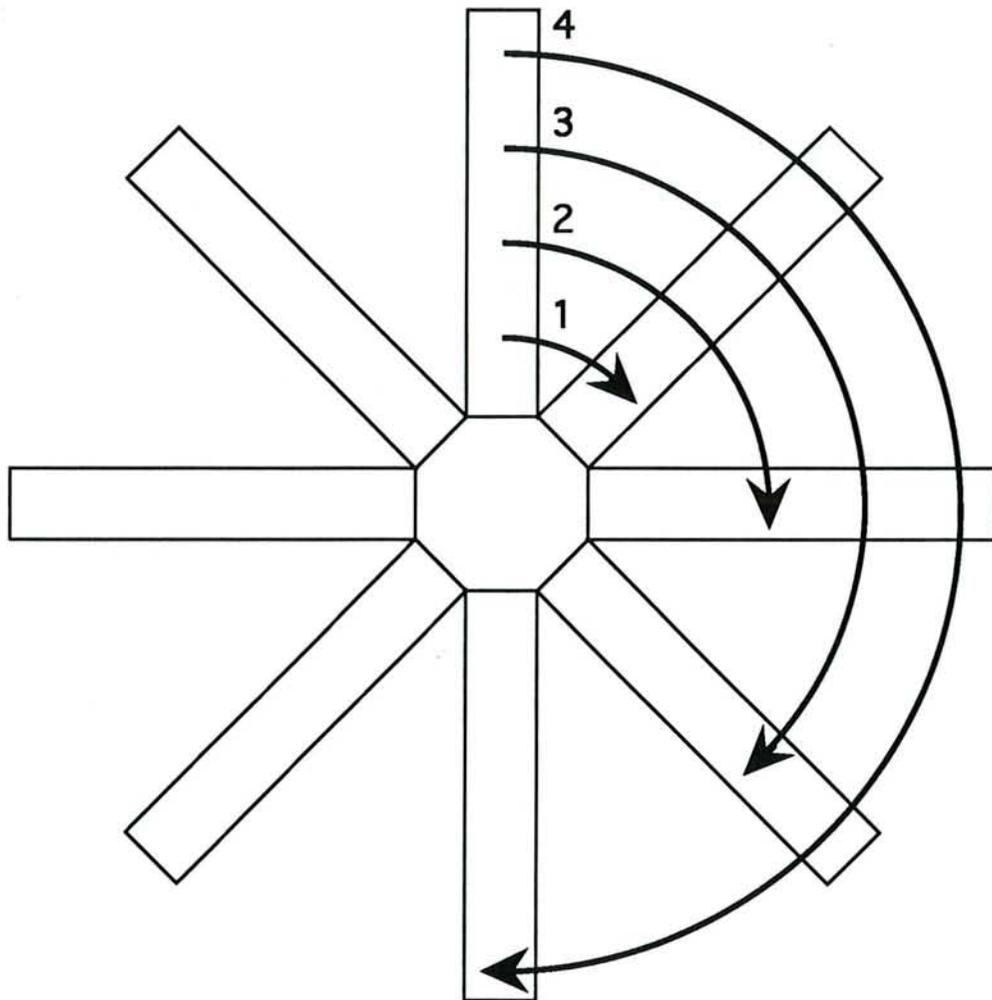


figure 21 : Vue du dessus du labyrinthe à 8 branches.

Les flèches représentent les différentes stratégies que peut choisir l'animal pour explorer le labyrinthe. La stratégie 1 consiste à choisir la branche située à 45° de la précédente. Dans la stratégie 2, le rat choisit la branche située à 90° de la précédente. Dans les stratégies 3 et 4, l'animal choisit la branche située respectivement à 135° et 180° de celle qu'il vient de visiter.

L'animal est placé dans le compartiment de départ qui est fermé par une porte guillotine. Lorsque le rat est face à la porte, celle-ci est levée pour lui permettre l'accès au labyrinthe. Dès que l'animal atteint un des compartiments situé à l'extrémité d'une des branches, il est retenu dans ce compartiment que l'on ferme au moyen d'une porte guillotine. Le rat est ramené au début du labyrinthe en substituant le compartiment qui contient l'animal à celui de départ, ce qui évite de manipuler l'animal entre les 2 essais.

Le temps maximum accordé pour un essai a été fixé à 5 minutes (une alternance est égale à 2 essais consécutifs). Dans ce test, ont été mesurés les temps nécessaires à l'animal pour sortir du compartiment de départ et pour pénétrer dans chacune des branches du labyrinthe (lorsque les 4 pattes ont dépassé la limite du compartiment ou de l'embranchement).

Le test a été réalisé une seule fois sans délai entre les 2 essais sur 27 animaux témoins et 26 traités avec le DZ.

7.1.3. Labyrinthe à 8 branches

a) principe

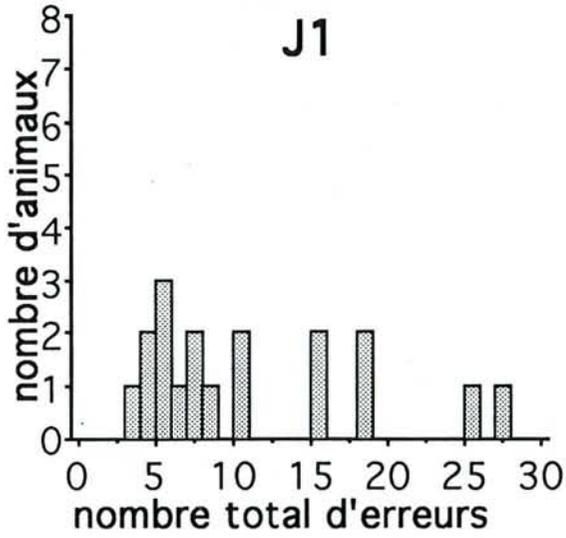
Le labyrinthe à 8 branches mis au point par Olton et Samuelson (1976) est un test très largement utilisé dès que l'on s'intéresse à la mémoire spatiale dans différentes espèces d'animaux. Le labyrinthe est constitué d'une aire centrale d'où partent huit branches disposées comme les rayons d'une roue (*figure 21*). Les animaux doivent parcourir les différentes branches pour récupérer une boulette de nourriture qui est placée dans chacune des branches.

Très rapidement, dès lors que l'on répète le test, les animaux deviennent de plus en plus efficaces dans le labyrinthe en évitant d'explorer plusieurs fois la même branche, ce qui leur permet de récupérer l'ensemble de la nourriture dans un minimum de temps et d'effort ainsi que l'illustre la *figure 22*. Ces résultats montrent donc que les rongeurs sont capables d'adopter un comportement intelligent et de développer une forme d'apprentissage de l'espace dans lequel ils évoluent.

De plus, il apparaît que l'efficacité avec laquelle les rats explorent le labyrinthe n'est pas perturbée par différentes modifications dans l'exécution de ce test comme l'augmentation du nombre de branches (Olton et coll., 1979 ; Roberts, 1979) ou le confinement de l'animal dans la zone centrale en cours de réalisation du test (Beatty et Shavalia, 1980).

L'orientation des rats, et donc leurs performances, dans le labyrinthe à 8 branches semblent dépendre principalement de la position de certains repères situés en dehors du labyrinthe (Suzuki et coll., 1980 ; Mazmanian et Roberts, 1983) mais également d'indices situés à l'intérieur du labyrinthe associés à chacune des branches prises séparément les unes

véhicule



diazépam

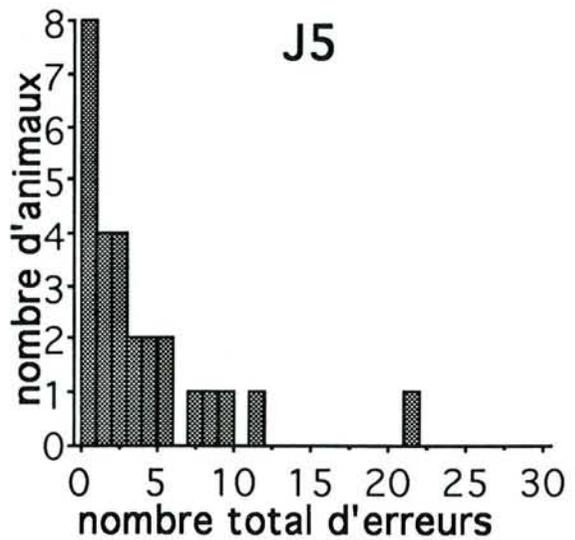
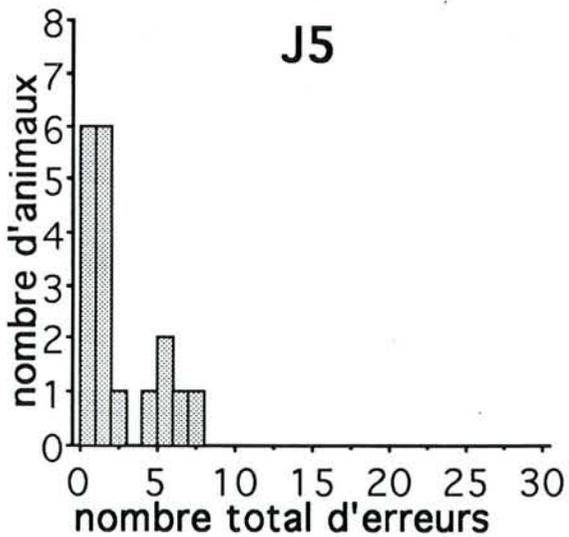
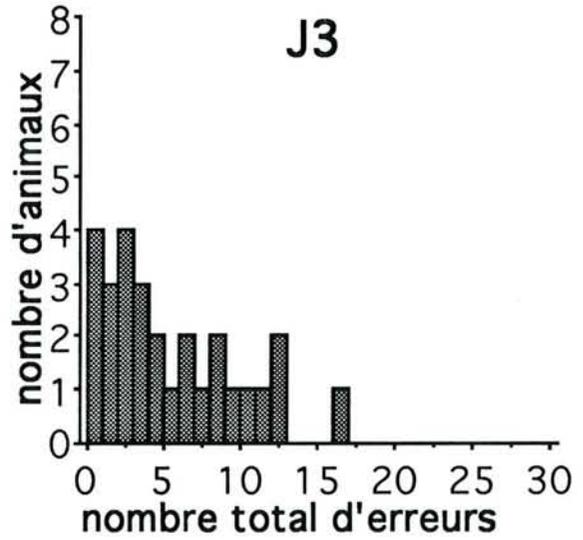
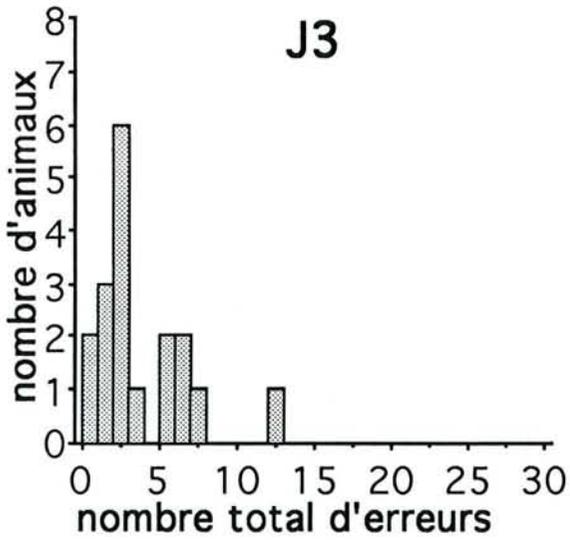
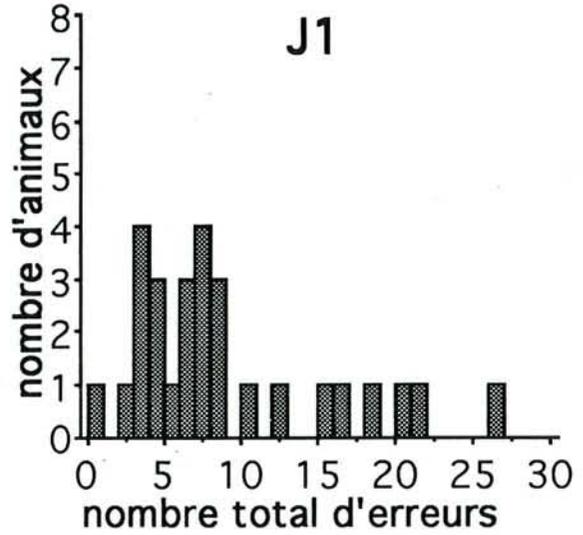


figure 22 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le nombre total d'erreurs que font les animaux dans le labyrinthe à 8 branches. Les résultats sont présentés sous forme de la fréquence des animaux qui effectuent un nombre d'erreurs donné lors des première (J1), troisième (J3) et cinquième (J5) séances.

Au fur et à mesure des essais, le nombre total d'erreurs effectués par les rats des 2 groupes expérimentaux diminue progressivement, démontrant que les animaux deviennent de plus en plus efficaces dans le labyrinthe et que les capacités d'apprentissage et de mémorisation ne sont pas affectées par le traitement.

des autres (Kraemer et coll., 1983). Ainsi récemment, Brown (1990) a montré qu'une simple modification de la longueur des branches du labyrinthe suffit pour induire une réduction importante des performances des animaux. Il semble, en fait, que la géométrie du labyrinthe dans le plan horizontal, joue un rôle essentiel dans la façon dont le rat se comporte au cours du test. Groberty et Schenk (1992) ont ainsi montré que la réduction des angles entre les différentes branches en dessous de 45° a pour conséquence une augmentation du nombre d'erreurs faites par les animaux au cours de l'essai, ce qui confirme les travaux de Schenk et coll. (1990) qui avaient constaté le même phénomène en plaçant deux des branches du labyrinthe en parallèle. Par contre, la modification de la pente des branches par rapport à l'horizontale reste sans effet sur les performances des rats (Groberty et Schenk, 1992).

Ces différents travaux confirment donc l'idée que l'animal développe et stocke, à partir de l'exploration du labyrinthe, une "carte" de l'environnement lui permettant de se représenter simultanément les relations spatiales entre les différents points remarquables du labyrinthe. Cependant, le fait que le rat utilise des repères propres au labyrinthe pour s'orienter suggère qu'il existe au moins un autre mécanisme cognitif, différent de la représentation spatiale du labyrinthe, qui sous-tend ce comportement d'exploration (Brown, 1992). Il s'agit de la notion de "route", une "route" étant une suite d'instructions peu variées, qui est orientée vers un but précis et dont l'exécution repose sur un ordre successifs d'opérations. Toute modification dans l'ordre d'exécution de ces instructions à partir des repères existants sur le trajet, a pour conséquence une désorientation de l'individu, lui enlevant toute chance d'arriver au but fixé.

Ces notions de "route" et "carte" ne sont sans doute que deux aspects des processus mis en jeu dans l'apprentissage et la mémorisation de l'espace (Brown, 1992) et dont le principal centre d'intégration au niveau cérébral est l'hippocampe (O'Keefe et Nadel, 1978 ; Olton et Samuelson, 1976 ; Olton et coll., 1979).

En fait, Olton et coll. (1979) ont observé une diminution des performances des animaux dans un labyrinthe à 8 branches après une lésion partielle ou totale de l'hippocampe. De nombreuses études ont montré par la suite (Barnes, 1988, pour revue) que le fait de placer des indices supplémentaires dans le labyrinthe induit la disparition des différences existant entre les performances des animaux lésés et celles des rats témoins. Ces résultats confirment donc bien l'hypothèse que la mémoire spatiale fait appel à plusieurs processus cognitifs qui peuvent être dissociés le cas échéant et que l'hippocampe est impliqué dans la représentation spatiale du labyrinthe, c'est-à-dire dans la capacité des animaux à mémoriser et utiliser des "cartes".

Ces résultats ont été confirmés par les travaux de O'Keefe et Nadel (1978) et O'Keefe et Speakman (1987) qui ont montré, en enregistrant l'activité électrophysiologique de 34 groupes cellulaires différents dans la partie dorsale de l'hippocampe alors que les rats explorent le labyrinthe, que les cellules de l'hippocampe s'activent sélectivement en fonction de l'endroit du labyrinthe où se trouve le rat.

Ces auteurs ont également observé, d'une part, la persistance d'une activité électrique dans certains de ces groupes de cellules lorsque les animaux sont placés dans un nouvel environnement, et d'autre part, une augmentation de cette activité quand on retire certains des repères présents en dehors du labyrinthe. Il ressort de ces résultats que les cellules de l'hippocampe sont à même de gérer un grand nombre de "cartes" spatiales différentes et qu'elles sont capables de réagir à des modifications de la configuration spatiale de l'environnement où se trouve l'individu et de corriger ainsi une ou plusieurs "cartes".

Plus récemment, Crusio et coll. (1987) ainsi que Schwegler et coll. (1990) ont mis en évidence dans différentes espèces génétiques de souris une étroite corrélation entre la taille des terminaisons synaptiques des fibres mossues de l'hippocampe et les performances dans ce type de labyrinthe. Pereira de Vasconcelos et coll. (1990b) en étudiant les effets d'une exposition néonatale au PhB sur le comportement du rat dans le labyrinthe à 8 branches suggèrent, de la même façon que pour le labyrinthe en T, le rôle prédominant des cellules granulaires du gyrus denté dans l'expression d'un comportement cohérent dans ce type de labyrinthe.

Une autre approche intéressante de ce test n'est plus de considérer les performances absolues des animaux mais d'étudier la stratégie qu'utilisent les rats dans le labyrinthe. Pour cela, il faut analyser les différentes branches visitées au cours des 8 premiers essais dans le but de déterminer si les rats utilisent une séquence particulière dans le choix des branches les unes par rapport aux autres pour simplifier le test. Ainsi, la stratégie 1 consiste, pour le rat, à choisir une branche adjacente à celle qu'il vient de visiter, la stratégie 2, une branche à 90°, la stratégie 3, une branche à 135° et la stratégie 4, une branche à 180° (*figure 21*). On considère que le rat utilise une stratégie lorsqu'il fait au moins 4 fois le même choix au cours des 8 premiers essais.

L'observation d'une stratégie est ainsi une façon de prendre en compte le degré d'utilisation par l'animal d'une représentation spatiale du labyrinthe : plus il opère des choix divergents mais corrects, plus il est probable qu'il se sert d'une stratégie pour se déplacer dans le labyrinthe et qu'il utilise des facultés cognitives spécifiquement spatiales. C'est ainsi que Magni et coll. (1979) ont observé que le pourcentage du choix d'une branche adjacente par un rat augmente avec le nombre des essais, suggérant que l'animal utilise rapidement une stratégie d'ordre 1 pour parcourir le labyrinthe, stratégie qui semble la plus logique pour lui

permettre de visiter toutes les branches dans un minimum de temps et avec le moins d'effort possible.

En conclusion, le labyrinthe à 8 branches aussi bien que le labyrinthe en T sont des tests simples à mettre en oeuvre qui permettent de mesurer la capacité d'un animal à apprendre et mémoriser les repères spatiaux nécessaires à son orientation dans le labyrinthe. Ce type de test a également permis d'établir l'importance de l'hippocampe dans l'apprentissage des relations spatiales (Brito et coll., 1983 ; Messer et coll., 1991 ; Thomas et Gash, 1986).

Cependant, l'hippocampe n'est pas la seule structure à jouer un rôle dans la mémorisation des relations spatiales. Ainsi, il a été montré, par des modèles lésionnels dans des expériences en labyrinthe en T ou à 8 branches, que des régions comme le noyau caudé, le septum et différentes aires corticales des zones frontale et temporale sont largement impliquées dans l'orientation spatiale des animaux (Goldwitz et Koch, 1986 ; Kolb et coll., 1983 ; Meunier et coll., 1991 ; Packard et coll., 1989 ; Thomas, 1972).

b) protocole

Les animaux sont testés dans un labyrinthe à 8 branches en bois gris. Chaque branche (60 x 12 x 17 cm, longueur x largeur x hauteur) représente la projection d'un côté d'une plate-forme octogonale centrale de 50 cm de diamètre (*figure 21*). Une boulette de nourriture (45 mg) est placée à l'extrémité de chaque branche et n'est pas remplacée au cours du test, si bien qu'un maximum de 8 récompenses peut être obtenu.

Dix-huit animaux témoins et 28 rats traités au DZ ont été testés dans le labyrinthe. Au préalable, ces animaux ont subi une diète afin de ramener leur poids à 85 % de sa valeur initiale et sont maintenus à ce poids pendant toute la durée du test.

L'animal est placé au centre de la plate-forme, face à une même branche pour chaque test et pour chaque rat (les branches du labyrinthe sont numérotées de 1 à 8). Les animaux sont laissés dans le labyrinthe jusqu'à ce qu'ils aient visité les 8 branches (les 4 pattes doivent avoir franchi la limite de l'embranchement), le temps maximum pour le test étant de 15 minutes. Pour chaque test, le temps d'entrée dans chaque branche et le numéro de chaque branche visitée sont relevés selon un ordre chronologique. Tous les animaux ont été testés pendant 5 jours consécutifs.

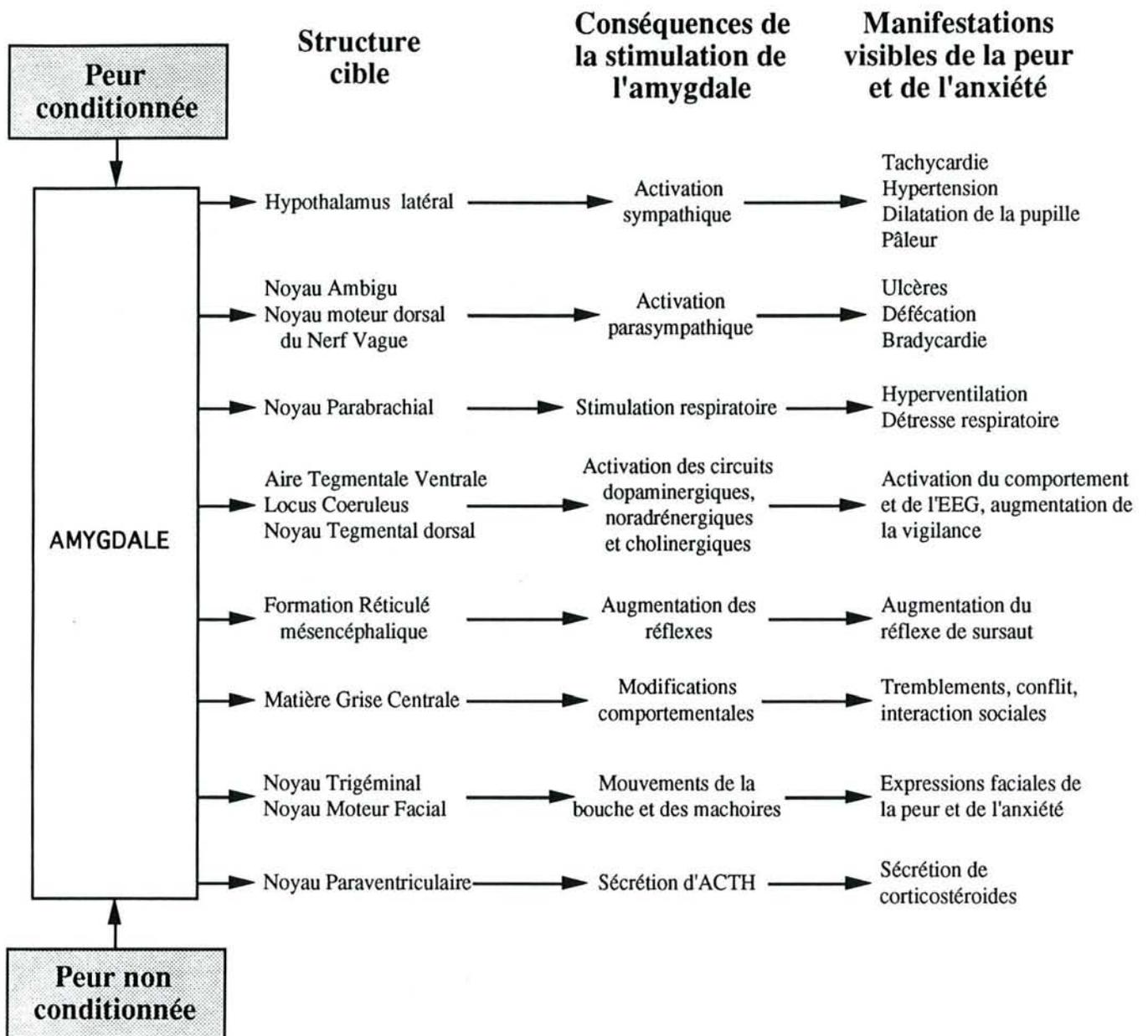


figure 23 : Diagramme représentant les connexions qui existent entre l'aire centrale de l'amygdale et différents noyaux de l'hypothalamus et du tronc cérébral qui pourraient être impliqués dans différents tests d'anxiété chez l'animal (d'après Davis, 1992).

7.2. Exploration en labyrinthe et anxiété

7.2.1. Rôle de l'amygdale dans le comportement d'anxiété

De nombreux travaux ont étudié les conséquences des lésions de l'amygdale sur le comportement du rat dans différents tests d'anxiété et ont permis d'établir qu'elle représente une structure clé dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété (Davis, 1992, pour revue). Par ailleurs, les modèles pharmacologiques basés sur des injections intracérébrales de BZD ou d'antagonistes sérotoninergiques ont permis de préciser le rôle particuliers des noyaux central et/ou basolatéral de l'amygdale dans l'expression de la peur et de l'anxiété (Hitchcock et Davis, 1986 ; Nagy et coll., 1979 ; Shibata et coll., 1982, 1986 ; Yadin et coll., 1991). Récemment, Green et Vale (1992) ont étudié les effets d'injections intracérébrales de midazolam dans les aires centrale et basolatérale de l'amygdale sur le comportement du rat dans le labyrinthe en croix surélevée, mettant en évidence un effet anxiolytique uniquement lorsque la drogue est injectée dans le noyau basolatéral. De plus, ces résultats sont confortés par la mise en évidence d'un nombre plus important de récepteurs aux BZD dans l'aire basolatérale que dans le noyau central (Niehoff et Kuhar, 1983). Cependant, du fait des résultats contradictoires de ces études quant au rôle de ces deux noyaux amygdaliens dans l'anxiété, ces auteurs suggèrent que l'ensemble des aires du complexe amygdalien serait bien impliqué dans les mécanismes de l'anxiété, mais de manière différente selon la nature du test utilisé pour générer cette anxiété.

Il est également à noter que des travaux du même type attribuent une fonction à l'amygdale dans les phénomènes de mémorisation, la lésion de cette région cérébrale bloquant les effets amnésiants des BZD (Ammassari-Teule et coll., 1991 ; Tomaz et coll., 1991, 1993).

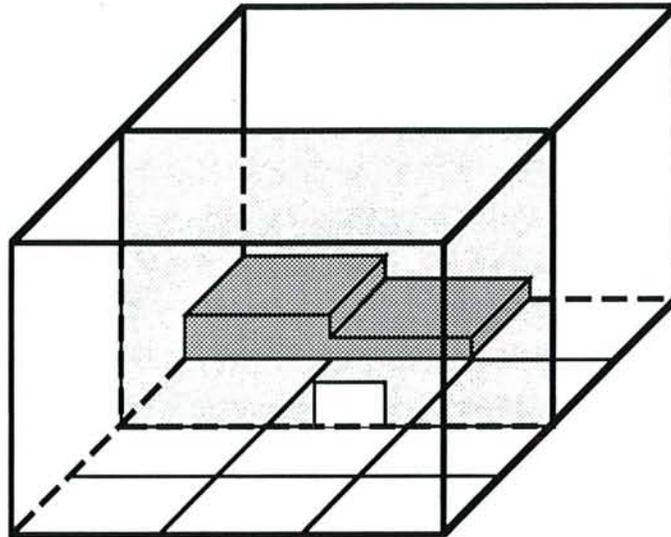
En s'appuyant sur ces données et sur le fait que l'amygdale possède de nombreuses afférences et efférences avec les autres régions du cerveau (Davis, 1992 ; *figure 23*), Miskin et Appenzeller (1987) suggèrent que cette structure serait le centre de la mémoire émotionnelle, sa principale fonction étant de conférer un contenu émotionnel aux événements sensoriels et de faire que les émotions structurent la perception et l'élaboration des souvenirs.

7.2.2. Boîte à deux compartiments

a) principe

Les tests d'open-field et de la cage claire/obscur sont classiquement utilisés pour étudier le comportement d'exploration du rat. Ils reposent d'une part sur la mesure de l'activité

(a)



(b)

10	11	12
7	8	9
4	5	6
1	2	3

figure 24 :
Vues en trois dimensions (a) et du dessus (b) de la boîte
à deux compartiments

locomotrice et d'autre part sur la capacité à explorer un environnement qui n'est pas familier pour l'animal.

Le test de la boîte à 2 compartiments, mis au point dans le laboratoire du Professeur Krafft (CNRS URA 233, "Aspects fonctionnels et développement des comportements), est dérivé de ces deux types de tests.

L'enceinte est divisée en 2 compartiments qui communiquent entre eux par une ouverture qui peut être condamnée au moyen d'une porte guillotine. L'un des compartiments est rendu plus attractif par rapport à l'autre par la présence d'un escalier de 2 marches (*figure 24*). Le principe général de ce test est d'observer le comportement de l'animal lorsqu'il est introduit, dans un premier temps, dans le compartiment vide de tout objet alors que la porte est fermée, puis lorsqu'on lui offre la possibilité d'accéder au second compartiment qui, outre l'espace inconnu qu'il représente, est supposé être plus attractif du fait de la présence de l'escalier.

Dans ces différents types de test, sont observés divers aspects représentatifs du comportement exploratoire de l'animal tels que l'activité locomotrice, le redressement, le toilettage, le contact avec un objet (Berlyne, 1960) et le nombre de transitions entre les 2 compartiments (Crawley et Goodwin, 1980).

En fait, Berlyne (1960) différencie trois niveaux d'intégration dans le comportement exploratoire :

- les réponses d'orientation qui sont de simples changements de l'orientation de la tête ou des organes sensoriels vers un stimulus.
- l'exploration locomotrice qui implique un déplacement du corps en direction du stimulus.
- la réponse d'investigation qui est constituée d'interactions actives avec le milieu (un objet par exemple) et qui entraîne une modification de ce milieu à la suite de l'action de l'animal (par exemple, saisie et manipulation de l'objet).

De surcroît, il faut différencier l'exploration "inspection" qui replace l'animal en contact avec des éléments déjà connus de l'environnement et l'exploration "investigation" qui met l'animal en contact avec un élément inconnu de l'environnement pour la première fois.

Un autre critère à prendre en compte est l'émotivité que suscitera chez l'animal un milieu nouveau ou un nouvel élément perturbant un milieu familier. En effet, quand l'animal est confronté à des stimulations nouvelles, il peut développer plusieurs types de réactions que Misslin et coll. (1990) désignent dans leur ensemble par le terme de "conduite néotique". L'animal peut ainsi manifester des conduites d'approche, d'investigation et d'exploration, des conduites d'évitement (néophobie) ou même des conduites d'agression (xénophobie). Un

animal confronté à une situation nouvelle qui est, en fait, la combinaison de multiples stimulations, se trouve pris dans un conflit entre la peur et la curiosité avec pour conséquence la génération d'une anxiété.

C'est ainsi que les tests d'exploration dans une enceinte à 2 compartiments comme la cage claire/obscur sont considérés comme des tests présentant un certain intérêt pour étudier les mécanismes de l'anxiété ainsi que les effets des drogues potentiellement anxiolytiques (Crawley et Goodwin, 1980 ; Crawley, 1981, 1985 ; Onaivi et Martin, 1989).

Ainsi, dans la cage claire/obscur, l'animal témoin passe la plus grande partie de la durée du test dans le compartiment sombre et manifeste, dans ce compartiment, une très grande activité locomotrice et exploratoire alors que le nombre de transitions entre les 2 compartiments reste relativement faible (Crawley et Goodwin, 1980 ; Crawley, 1981, 1985).

D'une manière générale, l'administration d'anxiolytiques comme le CDP ou le DZ induit une augmentation du nombre de transitions, un raccourcissement de la latence de première entrée dans le compartiment sombre ainsi que du temps passé et de l'activité exploratoire dans le compartiment éclairé (Crawley, 1981 ; Costall et coll., 1988 ; Kilfoil et coll., 1989 ; Pellow, 1986). Cependant, un étude récente suggère que le temps passé par l'animal dans le compartiment éclairé ainsi que son comportement en terme d'activité locomotrice et de redressements sont de meilleurs indicateurs du potentiel anxiolytique d'une drogue que le nombre de passages entre les 2 compartiments (Young et Johnson, 1991), ces auteurs n'observant aucune modification de ce paramètre après administration de DZ à des doses comprises entre 1 et 10 mg/kg.

De la même façon, les rats placés dans la boîte à 2 compartiments passent plus de temps dans la partie où se trouve l'escalier et développent une activité exploratoire nettement supérieure à celle observée lorsqu'ils sont dans le compartiment vide de tout objet démontrant que la présence d'un objet, ici un escalier, rend l'un des compartiments plus attractif que l'autre (Toniolo-Kulinicz, 1994). Par contre, le nombre de passages et la durée de station sur la plus haute marche de l'escalier restent relativement faibles par rapport au nombre de carrés traversés et à la durée du test (Toniolo-Kulinicz, 1994).

En effet, la présence de l'escalier que le rat peut gravir, provoque chez lui un comportement anxieux, l'animal étant partagé entre son comportement d'exploration d'une part et la néophobie d'autre part.

Le choix d'un escalier de 2 marches en tant qu'objet pour enrichir l'un des compartiments rappelle un test simple qui est très utilisé dans les tests de screening pharmacologique de drogues à visée anxiolytique ou sédatrice (Simiand et coll., 1984). Le nombre de marches et la hauteur de l'escalier sont alors plus importants par rapport à celui utilisé dans la boîte à 2 compartiments. Dans ce contexte particuliers, le nombre de marches gravies par l'animal

serait lié à la libération du comportement exploratoire alors que les redressements effectués sur les marches refléteraient l'anxiété (Simiand et coll., 1984). Ainsi, dans ce test, l'administration de BZD a pour conséquence une diminution du nombre de redressements avec ou sans modification de l'activité locomotrice selon que l'on ait un effet anxiolytique ou sédatif en fonction de la dose utilisée (Emmanouil et Quock, 1990).

La boîte à 2 compartiments est donc un test mis au point pour étudier le mode de résolution individuelle du conflit approche/évitement dans un milieu peu aversif comparativement à un autre labyrinthe très largement utilisé dans l'étude de l'anxiété et des substances anxiolytiques, le labyrinthe en croix surélevée (Toniolo-Kulinicz, 1994).

b) protocole

La boîte à 2 compartiments est constitué d'une enceinte carrée de 50 cm de côté qu'une cloison partage en deux compartiments de surface égale qui communiquent entre eux au moyen d'une porte coulissante (*figure 24*). Le sol de la boîte est quadrillé (2 x 6 cases numérotées) pour permettre de quantifier les déplacements de l'animal par sommation du nombre de cases parcourues pendant une séance et de localiser les comportements qui s'y produisent.

Le premier compartiment est vide de tout objet. Par contre, le second est équipé d'un escalier de deux marches, de 3 cm de hauteur chacune, dont la plus élevée recouvre la case 10. Cet élément est supposé enrichir le milieu en y renforçant le caractère nouveau de l'espace et doit permettre à l'animal de différencier de manière optimale les 2 compartiments.

Le protocole expérimental de ce test peut être décomposé en trois phases :

- **phase 1** : l'animal est déposé dans un coin du compartiment vide (dans la case 1), porte fermée. Il est maintenu dans ce compartiment pendant une minute au terme de laquelle la porte est ouverte.
- **phase 2** : elle correspond au temps que mettra un individu pour franchir la porte et passer d'un compartiment à l'autre pour la première fois.
- **phase 3** : elle débute à l'issue du premier passage de l'animal dans le compartiment "riche" et dure 3 minutes, temps au bout duquel l'animal est retiré du labyrinthe.

Dix-huit animaux témoins et 33 rats traités au DZ ont été testés dans le labyrinthe pendant 3 jours consécutifs. La durée d'une séance est variable, dans la mesure où la durée du test est de 3 minutes plus la latence du premier passage et que cette latence dépend du comportement des individus. D'autre part, la durée de la séance est plus courte les 2e et 3e jours de test, le rat étant déposé dans le compartiment vide alors que la porte est ouverte.

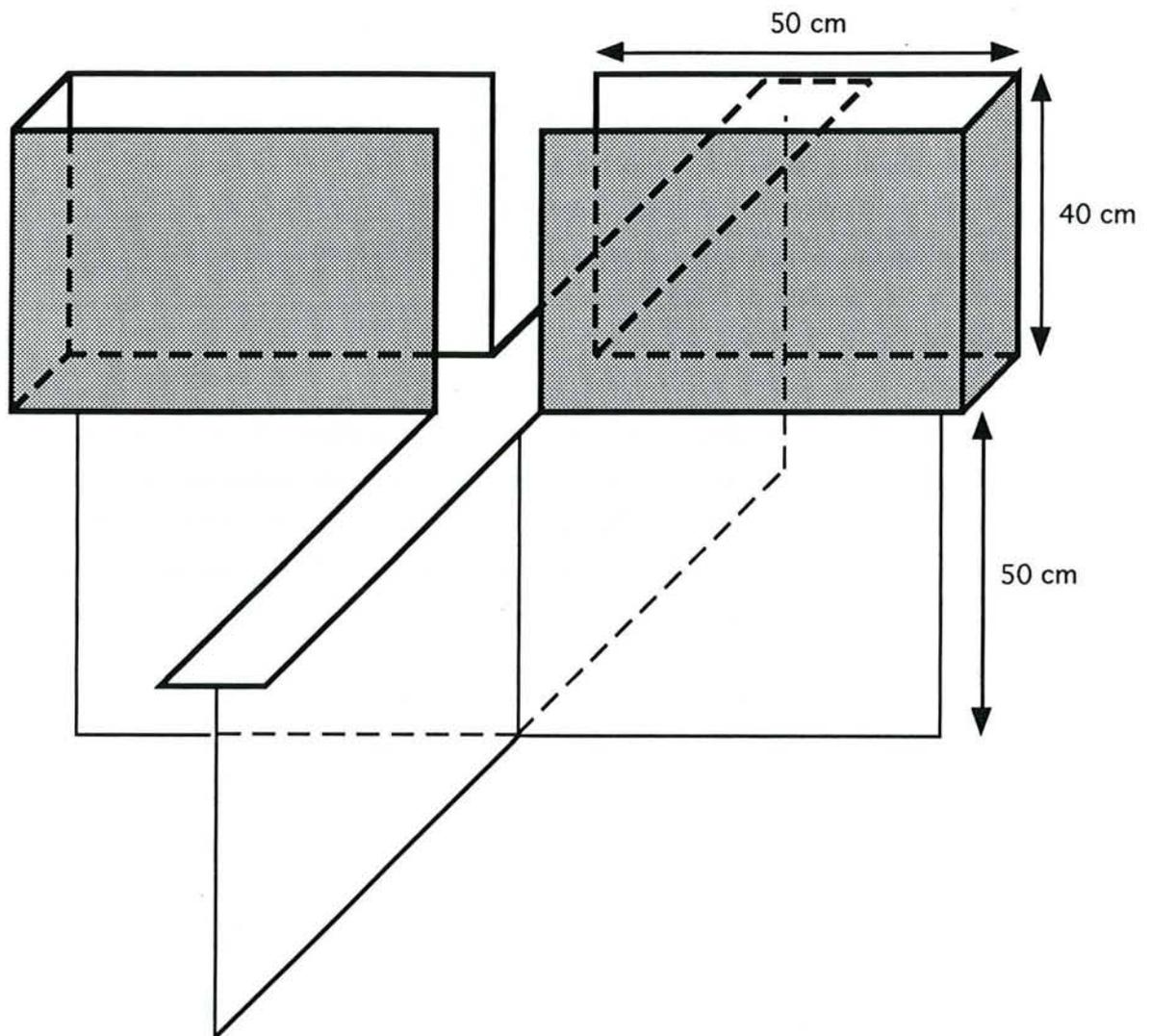


figure 25 : Vue en trois dimensions du labyrinthe en croix surélevée

L'ensemble des séances est enregistrée en vidéo. Les variables sont obtenues après dépouillement de ces bandes vidéo.

L'exploration proprement dite est évaluée à travers l'activité locomotrice (nombre de cases parcourues et de redressements), le nombre de transitions entre les 2 compartiments, l'exploration de l'escalier et plus précisément la fréquentation des cases 10 et 11.

La néophobie est évaluée par de faibles performances aux variables précitées, mais aussi par des variables plus spécifiques de l'émotivité comme la latence d'entrée dans le second compartiment, le temps passé dans chacun des compartiments, la durée de toilettage et le nombre de redressements sur chacune des 2 marches de l'escalier.

7.2.3. Labyrinthe en croix surélevée

a) principe

Le labyrinthe en croix surélevée est constitué de deux branches opposées entourées de cloisons verticales (dites fermées) et deux autres branches dépourvues de parois (dites ouvertes) (*figure 25*). Il représente, pour un rat qui y est placé pour la première fois, un milieu non familier donc attractif à explorer mais un milieu qui est particulièrement aversif, étant découvert et dominant un vide au niveau des branches ouvertes. Le labyrinthe en croix surélevée, mis au point par Handley et Mithani (1984) et validé par Pellow et coll. (1985) chez le rat et Lister (1987) chez la souris, est donc un test de choix pour l'étude de la neurobiologie de l'anxiété ainsi que des effets des drogues anxiolytiques et anxiogènes.

Il est basé sur un procédé mis au point par Montgomery en 1958 qui a montré que l'exposition à un lieu surélevé et découvert, engendrait chez le rat, une situation conflictuelle et donc une anxiété, le poussant d'une part à explorer un environnement nouveau et d'autre part à éviter de s'y aventurer par crainte du vide. Ainsi, un rat placé dans une cage présentant une issue qui donne accès à une plate-forme découverte et surélevée l'explorera beaucoup moins que si cette dernière est close. De la même manière, un rat placé au centre d'un labyrinthe en Y présentant une branche ouverte et l'autre entourée de cloisons verticales ira préférentiellement explorer la branche fermée.

Pellow et coll. (1985) ont ainsi vérifié les hypothèses de Montgomery en réalisant chez le rat, des expériences de confinement successivement dans les deux types de bras. Ils ont alors observé que les comportements de peur et d'anxiété (tremblements, défécations, immobilité) se produisaient de manière plus fréquente dans les bras ouverts que dans les bras fermés. D'autre part, les concentrations plasmatiques de cortisol sont plus élevées après confinement dans les branches ouvertes que dans les bras fermés (Pellow et coll., 1985). Ces résultats confirment donc le fait que l'exposition sur une branche ouverte est l'élément générateur d'un état de stress et d'anxiété chez le rat.

Dans des conditions physiologiques, l'animal explore les quatre branches du labyrinthe mais l'exploration est quasi-exclusivement orientée vers les bras fermés, le nombre d'entrées dans les branches ouvertes restant très faible par rapport au nombre total d'entrées (Pellow et coll., 1985). L'administration d'anxiolytiques se traduit par une augmentation du pourcentage des entrées et du temps passé dans les branches ouvertes avec ou sans réduction du nombre total d'entrées alors qu'un effet sédatif sera plutôt mis en évidence par une diminution du nombre total de branches visitées sans modification de leur répartition (Pellow et File, 1986 ; Pellow et coll., 1985 ; Kulkarni et Sharma, 1991).

Le principal avantage de ce test est qu'il est basé sur un comportement spontané du rat, à savoir l'exploration, et qu'il permet ainsi de s'affranchir de tous les problèmes liés à un éventuel conditionnement. Par contre, il semble que les animaux soient capables de développer très rapidement une tolérance vis-à-vis de ce test. Des études ont ainsi observé, d'une part, un accroissement du comportement d'anxiété lorsque le test est répété chez des animaux témoins (Rogers et coll., 1992) et d'autre part, l'absence de tout effet anxiolytique lorsque des BZD sont administrées à des animaux qui ont déjà acquis une expérience du labyrinthe (File, 1990 ; Lister, 1987). File et coll. (1990) ont montré que l'acquisition de l'expérience des branches ouvertes est le facteur essentiel de l'apprentissage de ce labyrinthe, le phénomène de tolérance étant plus marqué chez des animaux qui ont exploré les branches ouvertes lors d'un premier essai que chez des rats qui sont restés uniquement dans les bras fermés. D'autre part, il peut être aboli par l'administration d'une BZD à dose amnésiante lors du premier essai (File et coll., 1990).

De plus, cette tolérance ne semble apparaître qu'avec l'utilisation des drogues anxiolytiques. L'administration de traitements anxiogènes comme l'injection de FG 7142, un agoniste inverse des récepteurs aux BZD, ou l'exposition à l'odeur d'un prédateur tel que le chat n'induit aucune modification du comportement d'anxiété normalement observé dans ce labyrinthe, que les animaux soient testés pour la première fois ou qu'ils aient déjà acquis l'expérience des branches ouvertes (File et Zangrossi, 1993).

Enfin, récemment, File (1993) a montré qu'un allongement de la durée de la première séance dans le labyrinthe de 5 à 10 minutes permettait de faire réapparaître les effets anxiolytiques des BZD lors d'une deuxième séance. File (1993) suggère alors que le labyrinthe en croix surélevée générerait deux états d'anxiété, d'une part, un état général d'anxiété qui est mis en évidence lors d'une première séance dans le labyrinthe, et d'autre part, une phobie qui serait acquise au cours de la première séance et qui reste insensible à l'action des anxiolytiques au cours du deuxième essai. Or, chez l'animal, une anxiété de type phobie est un phénomène fugace qui peut disparaître dans un délai de 10 à 20 minutes après le début de l'exposition au labyrinthe (File et coll., 1992).

L'allongement de la durée de la première séance a donc pour conséquence la disparition de cette anxiété de type phobie, le comportement d'anxiété observé au cours d'un deuxième passage dans le labyrinthe redevenant alors sensible aux effets des anxiolytiques (File, 1993).

En plus de l'étude des drogues potentiellement anxiolytiques ou anxiogènes, le labyrinthe en croix surélevée est également très utilisé pour tenter de comprendre les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété. C'est ainsi que, par des modèles pharmacologiques ou lésionnels, des structures cérébrales comme le septum (Pesold et Treit, 1992 ; Treit et Pesold, 1990), l'hippocampe (Kostowski et coll., 1989), les noyaux du raphé (Bridley et coll., 1990 ; Critchley et coll., 1992) ou les corps mammillaires (Beracochea et Krazem, 1991) sont apparus comme étant des centres nerveux de l'anxiété, leur destruction se traduisant par des modifications du comportement d'anxiété dans ce labyrinthe.

Ces résultats confirment donc que l'anxiété peut s'exprimer sous de multiples aspects cognitifs, affectifs ou concernant la motivation, et impliquent à ce titre de très nombreuses régions du SNC.

b) protocole

Le labyrinthe est constitué de 4 branches (50 x 10 cm, longueur x largeur) disposées l'une en face de l'autre deux par deux et d'une zone centrale de 10 cm de côté. Deux des branches sont fermées par des parois verticales hautes de 40 cm, les 2 autres restant ouvertes (*figure 25*). L'ensemble est surélevé de 50 cm par rapport au sol, ce qui rend le milieu particulièrement et délibérément aversif.

L'animal est déposé à l'extrémité d'une branche fermée et son comportement est alors observé pendant une période de 5 minutes. L'ensemble du dispositif est nettoyé avec de l'alcool dilué entre chaque animal. La séance est enregistrée en vidéo et les variables sont obtenues après dépouillement de ces bandes vidéo.

Pour le dépouillement des données, on considère qu'un rat change de localisation lorsque les 4 pattes ont franchi la limite des différentes parties du labyrinthe, à savoir, la zone centrale, les branches fermées et les branches ouvertes.

7.3. Comportement social : situation de contrainte d'accès à la nourriture

7.3.1. Principe

L'étude du comportement social représente un moyen important dans la compréhension des mécanismes de l'anxiété et des effets des substances anxiolytiques.

Jusqu'à présent, le modèle d'étude des interactions sociales développée par File (1980) reste le plus utilisé. Il consiste à observer les types d'interactions et le comportement locomoteur de rats confrontés deux à deux dans un environnement familier ou non et dans des conditions variables d'éclairage. L'administration chronique de BZD en période postnatale se traduit dans ce test par une augmentation du nombre des interactions ainsi que des réactions d'agressivité envers un rat provenant d'une communauté étrangère (File et Tucker, 1983 ; File, 1986a, 1986c).

Plus récemment, des procédures visant à étudier le comportement social de groupes de rats placés dans une situation de contrainte d'accès à la nourriture et donc dans un état psychologique lié à une situation beaucoup plus complexe que l'exposition à un environnement nouveau, au vide ou à un congénère ont été développées (Colin et Desor, 1986 ; Gentsch et coll., 1988a). Ces modèles permettent de définir au sein d'un groupe des différenciations dans le statut social des animaux qui sont étroitement liées à l'état d'émotivité et d'anxiété des individus qui est généré par la contrainte et dont on peut admettre qu'il est beaucoup plus proche de l'anxiété telle qu'elle est perçue chez l'homme. C'est ainsi que la position sociale des animaux dans un groupe s'avère être sensible à l'action des anxiolytiques, le statut d'un animal pouvant être modifié lorsqu'on lui administre une drogue anxiolytique de type BZD ou antagoniste sérotoninergique (Gentsch et coll., 1988b, 1989, 1990 ; Joly et Sanger, 1991 ; Maitre, 1991).

Le modèle de difficulté d'accès à la nourriture mis au point par Colin et Desor (1986) oblige les animaux à plonger dans un aquarium et à nager en apnée jusqu'à une mangeoire. Par manque d'appui, les rats ne peuvent pas consommer les croquettes de nourriture sur place et sont contraints, pour pouvoir s'alimenter, de regagner la cage d'habitation.

Dans cette expérience, les animaux sont placés par groupe de trois ou six individus par cage. Ainsi, au sein d'un groupe de rats d'une même cage, il apparaît une différenciation comportementale qui se traduit par l'apparition de deux grandes catégories d'animaux :

- les rats Transporteurs ou Plongeurs qui nagent et accèdent à la nourriture.
- les animaux Non Plongeurs qui ne nagent pas et obtiennent des croquettes en les volant aux Transporteurs.

Le taux de différenciation, c'est-à-dire le nombre de groupes dans lesquels apparaissent des Non Plongeurs augmente avec l'effectif de ces groupes. Il est de 10 % pour des groupes de deux animaux, 50 % pour des groupes de trois et 100 % pour des groupes de six rats (Desor, 1994).

D'autre part, les Transporteurs ne constituent pas une catégorie homogène (Desor, 1994). Ainsi, il est possible de différencier deux statuts parmi cette population :

- les rats Transporteurs Ravitailleurs qui se font voler la nourriture par les animaux Non Plongeurs après l'avoir ramenée dans la cage.
- les rats Transporteurs Autonomes qui plongent pour leur propre compte et réussissent à défendre la nourriture qu'ils sont allés chercher.

a) stabilité et régulation de la différenciation sociale

Ce phénomène de différenciation est particulièrement stable. Ainsi, parmi six groupes entraînés quotidiennement pendant huit mois, aucun changement notable de la distribution de ces trois profils n'a été décelée et la conservation des profils a été observée jusqu'à deux semaines de suspension complète de l'entraînement (Desor, 1994).

Ces profils semblent s'agencer par paires d'individus. Ainsi, un Non Transporteur est souvent apparié à un Transporteur préférentiel (Peignot, 1989). Cette répartition est également très stable et contribue, à long terme, à une réduction des conflits voire à leur extinction complète au sein du groupe. Le Transporteur finit par ne plus résister aux assauts de son congénère, il semble progressivement se "résigner" en intégrant le caractère inéluctable de l'issue du conflit. Ce comportement révèle aussi une adaptation à une contrainte sociale : le fait de céder la nourriture rapportée sans résister permet au Transporteur Ravitailleur de repartir très vite chercher une autre croquette alors que le Non Transporteur se satisfait de celle qu'il a déjà ramené.

D'autre part, le statut des rats dans une colonie est flexible. Ils peuvent changer de catégorie à la suite de remaniements expérimentaux des groupes. Ainsi, des nouveaux rats Non Transporteurs apparaissent dès le 2ème jour du test dans des groupes constitués uniquement de Transporteurs et inversement. Cette plasticité suggère que ces catégories sont réparties au sein d'un groupe selon un équilibre dynamique qui est réévalué en permanence (Desor, 1994).

b) différenciation sociale et anxiété

Cette situation de contrainte d'accès à la nourriture semble également être un modèle intéressant pour l'étude des mécanismes de l'anxiété et des effets des drogues anxiolytiques telles que les BZD (Desor et coll., 1987).

En effet, l'apparition de l'eau et l'augmentation de son niveau dans l'aquarium provoque chez les animaux un conflit entre le besoin d'aller chercher de la nourriture et la contrainte de traverser un milieu aquatique pour accéder à la mangeoire qui se traduit par des hésitations et des tentatives avortées de mise à l'eau. Cependant, certains rats se mettent à franchir cette barrière aquatique assez rapidement. Il semble donc, qu'à un certain moment au cours de la phase de mise en eau progressive de l'aquarium, l'anxiété relative au fait de quitter un support solide soit suffisamment forte pour que certains individus n'accèdent plus à la mangeoire. Dans ce cas, les Transporteurs apparaissent comme étant les rats les moins émotifs face à l'eau.

Pour confirmer cette hypothèse, les taux de cortisol plasmatiques ont été dosés dans les différentes populations de rats au sein de ce modèle (Carmaux, 1987). Il apparaît ainsi que, pendant la période du test, les Ravitailleurs présentent une diminution significative de leur cortisolémie par rapport au taux basal mesuré avant la mise en situation de contrainte d'accès à la nourriture alors que ces taux restent identiques lorsqu'il s'agit d'animaux Non Transporteurs ou Autonomes.

Par ailleurs, Maitre (1991) a testé les trois types de sous-population différenciés dans ce test dans le labyrinthe en croix surélevée. Le nombre total d'entrées dans les branches est identique dans les trois groupes d'animaux mais leur répartition est différente. Lors d'un 2ème passage, les Ravitailleurs et les Autonomes réalisent significativement plus d'entrées dans les bras ouverts que les Non Plongeurs et y passent plus de temps, ce qui indique que les animaux de ces deux populations présentent un niveau d'anxiété moins élevé que les Non Plongeurs.

Une autre expérience a été également réalisée pour diminuer au moyen d'un anxiolytique le niveau d'anxiété de la moitié de l'effectif de chaque groupe (Maitre, 1991 ; Toniolo-Kulinicz, 1994). Ainsi, l'administration chronique de DZ (1,25 mg/kg/jour, i.p.) au cours des 10 jours d'installation de la contrainte induit l'apparition d'une proportion significativement plus élevée d'animaux de type Ravitailleurs par rapport au groupe de rats non traités, ces derniers réagissant à cette différenciation en adoptant préférentiellement le profil Non Transporteur. Le traitement, en modifiant les propriétés de certains individus dès le début de l'affrontement de la contrainte, a donc modifié leur devenir social.

En conclusion, cette procédure expérimentale induit parmi une population subissant une contrainte environnementale, l'apparition de profils comportementaux très différenciés et stables dans le temps qui ne sont en fait que le reflet d'une adaptation du groupe à cette contrainte. D'autre part, cette situation n'est pas à proprement parler une situation de compétition telle qu'elle est décrite dans les phénomènes de dominance, l'accès à la nourriture étant une activité qui resterait strictement individuelle si la contrainte de l'eau ne venait

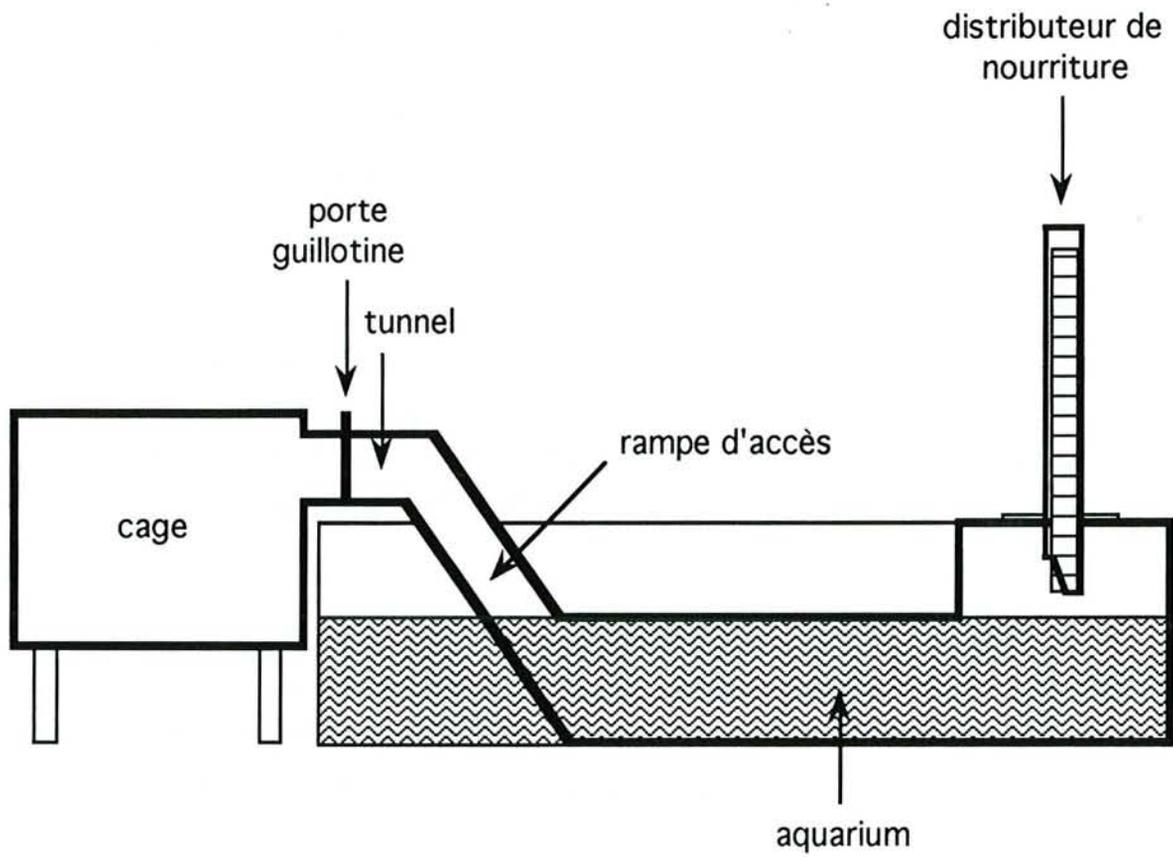


figure 26 :
 représentation schématique du dispositif expérimental dénommé "piscine"
 de mise en situation de contrainte d'accès à la nourriture.

s'interposer. Ces différents éléments, ainsi que le fait que les rats ne sont pas figés dans un statut, suggèrent donc le rôle crucial du facteur social dans l'apparition de la différenciation comportementale, facteur social dans lequel le caractère propre d'un individu et notamment son émotivité va jouer.

7.3.2. Protocole

Le dispositif expérimental est constitué d'une cage d'habitation grillagée (50 x 40 x 30 cm) reliée par un tunnel à un aquarium (120 x 20 x 30 cm, longueur x largeur x hauteur) rempli d'eau et couvert par une plaque en plexiglas (*figure 26*). Une porte coulissante permet de commander l'accès à l'aquarium. A l'extrémité de l'aquarium se trouve un distributeur unitaire de croquettes de nourriture, l'extrémité biseautée de la mangeoire laissant dépasser une partie de la croquette engagée pour la rendre accessible à l'animal (*figure 26*).

Dans cette expérience, les rats sont placés par groupe de six dans la cage attenante à l'aquarium. L'ensemble de l'expérimentation se déroule en plusieurs phases :

- phase 1 : familiarisation avec l'environnement.

Pendant deux jours consécutifs, les rats sont placés dans le dispositif, porte ouverte, aquarium à sec, pendant trois heures consécutives pour qu'ils apprennent à situer la source de nourriture. Les animaux sont remis dans leur cage d'élevage à l'issue de chaque séance.

- phase 2 : familiarisation avec la contrainte

Cette phase correspond à la mise en eau progressive de l'aquarium. Celui-ci est progressivement rempli d'eau pendant six jours (1 puis 2, 5, 10, 15 cm) jusqu'à immersion complète le dernier jour.

- phase 3 : alimentation

Cette phase représente l'expérience proprement dite. Au cours d'une séance de durée limitée à trois heures, les animaux doivent plonger en apnée pour aller chercher des croquettes de nourriture qu'ils ne pourront consommer que dans la cage. C'est au cours de cette phase qui est enregistrée en vidéo que seront examinées les différentes variables de ce test, à savoir le statut des animaux dans la colonie (Non Transporteurs, Transporteurs Ravitailleurs et Autonomes) ainsi que le nombre de transports, le nombre de vols, la durée de possession de nourriture ...

Trente animaux témoins et trente rats traités avec le DZ répartis en dix groupes de six rats chacun (trois traités avec le véhicule et trois qui ont reçu le DZ) ont été testés dans ce dispositif de contrainte d'accès à la nourriture. Ces animaux ont été pris au hasard dans le pool de rats qui a été utilisé pour les tests individuels. Au préalable, ils ont subi une diète afin de ramener leur poids à 85 % de sa valeur initiale.

7.4. Exposition chronique précoce aux benzodiazépines : effets à long terme sur le comportement de l'animal adulte.

Plusieurs études ont observé les effets à long terme d'une administration chronique précoce de BZD sur différents types de comportement chez le rat adulte. Il ressort de ces études que les performances des animaux sont très variables en fonction de la molécule et de la dose utilisée ainsi que de la période au cours de laquelle est pratiqué le traitement.

7.4.1. Exposition prénatale

Concernant l'activité locomotrice et le comportement d'exploration, Gai et Grimm (1982) rapportent que l'administration de DZ (2,5, 5 et 10 mg/kg/jour) du 4^{ème} au 20^{ème} jour de gestation induit, à l'âge de 35 jours, un allongement de la latence d'entrée dans un open-field ainsi qu'une baisse du nombre de redressements qui sont dose-dépendants alors que le nombre de carrés traversés n'est pas modifié. Par contre, les travaux de Frieder et coll. (1984a) montrent que l'activité des rats dans un open-field à 35 jours d'âge postnatal n'est pas modifiée par l'administration de DZ (10 mg/kg/jour) que celle-ci ait lieu au cours de la seconde ou la troisième semaine de gestation. De même, l'administration de DZ (Barbier et coll., 1991 ; Shore et coll., 1983) ou de CDP (Perruzzi et coll., 1983 ; Adams, 1982) pendant la gestation ne fait apparaître aucune modification de l'activité locomotrice et du comportement d'exploration mesurés vers le 20^{ème} jour après la naissance dans différents tests comme la planche à trous ou l'open-field.

Les effets de l'administration chronique de BZD en période prénatale sur les performances des animaux dans les tests de conditionnement, actifs ou passifs, sont contradictoires en raison des méthodologies employées qui diffèrent d'une étude à l'autre, de la période de gestation pendant laquelle est administré le traitement, de la molécule et de la dose utilisée. Les BZD induisent ainsi, soit de meilleures performances des animaux dans l'acquisition du comportement d'évitement (Harris et Case, 1979), soit pas de modifications (Adams, 1982), soit des déficits dans la mémorisation de ces comportements (Perruzzi et coll., 1983). Les travaux de Gai et Grimm (1982) et Frieder et coll. (1984a) semblent cependant confirmer les effets délétères de l'exposition chronique aux BZD au cours de la gestation, sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation. Ainsi, dans un labyrinthe à 6 branches où l'animal doit faire un choix en fonction de la couleur des branches pour accéder à un biberon d'eau, le DZ, uniquement lorsqu'il est administré pendant la 3^{ème} semaine de gestation, induit une augmentation du nombre d'erreurs par rapport aux témoins ainsi qu'un allongement du temps d'exécution du test. De même, Livezey et coll. (1986b) observent des déficits de la mémoire de travail dans un labyrinthe à 8 branches chez des animaux âgés de 6 mois qui ont subi une exposition de DZ (5 à 7,5 mg/kg/jour) du 15^{ème} au 20^{ème} jour de gestation. Ces

auteurs attribuent ces déficits plutôt à un état chronique d'hyperexcitabilité et à un manque d'attention générés par l'exposition chronique au DZ qu'à des altérations fonctionnelles au niveau cérébral. Cette hypothèse est confirmée par les travaux de Benton et coll. (1985) qui ont montré que les rats exposés au DZ apprennent plus vite le labyrinthe à 8 branches jusqu'au 5ème jour de test avant d'avoir des performances qui reviennent au niveau de celles observées chez les témoins les jours suivants.

Ces résultats suggèrent donc que les BZD, administrées pendant la dernière semaine de gestation chez le rat, provoquent des modifications des processus de maturation au niveau de certaines structures cérébrales avec des conséquences à court et à long terme sur différents types de comportement (cf. chapitre 6.2. pour les effets des BZD sur le développement neurocomportemental du rat).

7.4.2. Exposition postnatale

Les études concernant le comportement exploratoire et locomoteur chez l'animal adulte montrent que l'administration chronique de DZ au cours des premiers jours de vie postnatale induit à long terme une hyperexcitabilité motrice ainsi qu'une augmentation du nombre de redressements dans un open-field (Frankova et Jakousek, 1976 ; Frieder et coll., 1984a). Par contre, l'administration d'autres molécules comme le lorazépam ou le CGS 8216, un agoniste des récepteurs aux BZD, au cours de la période postnatale ne provoque pas de perturbations de l'activité motrice et de l'exploration dans l'open-field ou la planche à trous (File et Tucker, 1983, 1984a, 1984b). Cependant, comme dans le cas de l'administration prénatale de DZ, le nombre de redressements est diminué dans ces tests avec le lorazépam (File et Tucker, 1983). Aucune hypothèse n'a pu être formulée pour expliquer cette discordance entre la réduction du nombre de redressements et l'absence d'effets à long terme des BZD sur l'activité exploratoire.

Dans les tests de conditionnement, l'administration postnatale de BZD induit chez l'animal adulte une baisse des performances, essentiellement de la mémorisation à long terme. Ainsi, l'exposition à différentes BZD pendant les premières semaines de vie postnatale a pour conséquence un allongement du temps de réaction à un choc électrique 24 heures après le début du conditionnement alors qu'une minute après, aucune différence n'a été observée par rapport aux témoins. Le DZ induit également une augmentation du nombre d'erreurs dans le labyrinthe de Lashley (Fonseca et coll., 1976) et dans le labyrinthe à 6 branches décrit par Frieder et coll. (1984a), les tests étant répétés pendant plusieurs jours consécutifs.

D'autre part, il a été démontré qu'un traitement chronique avec différentes BZD peut induire des modifications du comportement social des animaux observés dans le test d'interactions sociales développé par File (1980). Ainsi, l'administration de DZ a pour conséquence une augmentation des interactions sociales avec des congénères qui ont subi le

même traitement uniquement lorsqu'ils sont placés dans un environnement qui ne leur est pas familier, une diminution du comportement de soumission et donc de la peur ressentie par l'animal lorsqu'il est placé dans une communauté étrangère de rats et une augmentation de l'agressivité envers des intrus qui proviennent d'une autre communauté (File et Tucker, 1983 ; File, 1986a, 1986c). L'utilisation de CGS 8216 provoque également une augmentation du temps et du nombre des interactions sociales, mais à l'inverse du DZ, seulement lorsque les animaux sont maintenus dans leur environnement habituel (File et Tucker, 1984b). Contrairement au DZ, l'administration postnatale de lorazépam se traduit par un accroissement de la soumission des animaux traités avec cette drogue lorsqu'ils sont introduits au sein d'un groupe de rats non traités (File et Tucker, 1983).

Ces résultats suggèrent donc un possible effet anxiolytique à long terme des BZD ainsi que des interférences dans les processus d'apprentissage et de mémorisation qui peuvent être modulés en fonction de la période de traitement, de la molécule utilisée et selon le caractère plus ou moins aversif et/ou contraignant des tests qui ont été utilisés.

"Effects of neonatal administration of diazepam on spatial memory and on social and exploratory behavior of adult male rats."

H. Schroeder, A.C. Humbert, A.M. Toniolo-Kulinicz, D. Desor, A. Nehlig

Psychopharmacology, 1994, (en préparation)

Tableau 2 : Effets d'un traitement chronique précoce au DZ sur le comportement du rat adulte dans un labyrinthe en T.

		VEHICULE (n=27)	DIAZEPAM (n=26)	Significativité
Alternance spontanée	oui	21 (77,8 %)	12 (46,2 %)	**
	non	6 (22,2 %)	14 (53,8 %)	
Latence de sortie du compartiment de départ (médiane - quartiles)				
	1er essai	6,0 (3,6-9,6)	5,9 (2,4-8,4)	n.s.
	2ème essai	3,3 (2,4-8,4)	3,6 (2,4-4,8)	n.s.
Latence d'entrée dans une des branches (médiane - quartiles)				
	1er essai	12,9 (9,0-19,8)	12,0 (7,1-19,8)	n.s.
	2ème essai	7,5 (6,0-11,4)	8,1 (5,4-11,4)	n.s.

** $p < 0,01$, différence significative par rapport au véhicule (test du Chi2).

Les résultats de l'expérimentation au 2DG-(¹⁴C) décrite précédemment (Schroeder et coll., 1994b ; chapitre 4) montrent que l'administration chronique de DZ du 2^{ème} au 21^{ème} jour après la naissance, provoque chez des animaux adultes, soit trente-neuf jours après l'arrêt du traitement, des baisses significatives de l'activité fonctionnelle cérébrale dans 22 % des structures étudiées telles que le septum, le thalamus, l'hippocampe, les corps mammillaires et différentes aires corticales limbiques et sensorielles. Le but du présent travail est d'étudier les effets des modifications à long terme du métabolisme énergétique cérébral induites par le DZ sur le comportement du rat dans une série de tests dont on sait qu'ils sont corrélés à l'intégrité fonctionnelle de certaines régions du cerveau (cf. chapitre 7).

Les comportements d'apprentissage, de mémorisation, d'exploration et d'anxiété ont été étudiés au moyen du labyrinthe en T, du labyrinthe à 8 branches, de la boîte à 2 compartiments et du labyrinthe en croix surélevée chez des animaux âgés de 60 jours selon les protocoles décrits précédemment. Les tests ont été réalisés dans des groupes différents de 18 à 27 animaux traités avec le véhicule et de 14 à 33 rats exposés au DZ. A la fin de ces tests, 30 animaux traités avec le véhicule et 30 rats exposés au DZ ont été pris au hasard pour constituer 10 groupes de six animaux (trois véhicule et trois diazépam par groupe) qui ont servi à l'étude du comportement social dans la situation de contrainte d'accès à la nourriture.

Le DZ induit une diminution significative du taux d'alternance spontanée dans le labyrinthe en T par rapport au véhicule (*tableau 2*) alors que l'activité locomotrice des animaux reflétée par la latence de sortie du compartiment de départ et la latence d'entrée dans une branche, reste identique dans les deux groupes au cours des 2 essais (*tableau 2*).

Dans le labyrinthe à 8 branches, le comportement d'exploration des animaux, exprimée par le nombre de branches visitées par minute, est plus importante chez les rats traités au DZ que chez les témoins du 2^{ème} au 5^{ème} jour de test. Cependant, cette différence n'est statistiquement significative que lors de la 4^{ème} séance (*figure 27b*). Au même moment, le temps total d'exécution du test, c'est-à-dire le temps mis par les animaux pour visiter au moins une fois toutes les branches du labyrinthe reste comparable entre les deux groupes à J1, J3 et J5 alors qu'il est plus court de 17 et 25 % au 2^{ème} et 4^{ème} jour de test, mais cette différence n'est pas significative (*figure 27a*). D'autre part, le nombre de branches visitées avant la 1^{ère} erreur par les rats exposés au DZ augmente constamment au fur et à mesure des différents essais. Lors de la 1^{ère} séance, ce nombre est significativement plus faible dans le groupe DZ que dans le groupe témoin. Il est comparable au 2^{ème} jour de test puis devient significativement plus important lors des trois séances suivantes (*figure 27c*). Simultanément, le DZ n'induit aucune modification de la latence de la 1^{ère} erreur par rapport au véhicule tout au long des différents jour de test, à l'exception d'une diminution de 30 % à J5 mais qui n'est pas significative (*figure 27d*).

De plus, le nombre d'animaux développant une stratégie pour explorer le labyrinthe n'est pas différent dans le groupe DZ de celui observé avec le véhicule et ce, quelle que soit le type de stratégie utilisée (*figure 28*). Cependant, les animaux traités au DZ ont tendance à utiliser les stratégies d'ordre 2 et 3 pour explorer le labyrinthe pendant les premières séances de test.

Les résultats du labyrinthe à 8 branches indiquent que le DZ n'induit aucune perturbation des capacités d'apprentissage et de mémorisation des animaux. En effet, le nombre total d'erreurs faites au cours d'une séance est le même dans les deux groupes quelque soit le jour du test. De plus, les animaux traités au DZ ont le temps de visiter une branche supplémentaire par rapport aux témoins avant de faire la 1ère erreur, ce qui montre que ni la mémoire de travail utilisée par les animaux pour se souvenir des branches déjà visitées, ni la mémoire de référence nécessaire à la compréhension du principe du test ne sont perturbés par le DZ.

A l'inverse, la baisse significative du taux d'alternance spontanée observée dans le labyrinthe en T chez les animaux exposés au DZ pourrait suggérer une défaillance de la mémoire de travail alors que la mémoire de référence n'a pas été testée, le test n'ayant pas été répété. Cette discordance avec les résultats du labyrinthe à 8 branches pose plutôt le problème de la motivation exercée par le test sur l'animal. En effet, le labyrinthe en T ne représente qu'un milieu nouveau et relativement simple à explorer alors que la motivation exercée par le labyrinthe à 8 branches qui est d'ordre alimentaire, est beaucoup plus forte car elle touche à la survie des animaux.

D'autre part, les résultats du labyrinthe à 8 branches indiquent que les animaux traités au DZ semblent désinhibés par rapport à ceux qui ont reçu le véhicule. Cette désinhibition est reflétée par une activité d'exploration plus importante chez les rats exposés au DZ alors que le temps mis pour faire le test reste identique ou devient plus court que celui observé dans le groupe témoin.

Dans la boîte à 2 compartiments, l'administration précoce de DZ n'induit aucune modification de l'activité locomotrice par rapport au véhicule au cours des trois jours de test (*figure 29*). De même, le temps total passé dans chacun des compartiments ainsi que le nombre de transitions entre les deux côtés de la boîte restent comparables dans les 2 groupes (*figure 30*). Par contre, la latence du 1er passage du compartiment pauvre vers le compartiment riche est significativement augmentée de 45 % par le DZ par rapport au véhicule lors du 2ème jour de test alors qu'elle n'est pas modifiée à J1 et J3 (*figure 30a*).

Dans le compartiment riche, le nombre de passages et la durée de station sur les deux cases surélevées (les cases 10 et 11) sont significativement augmentés à J1 chez les animaux traités au DZ par rapport au véhicule alors que le nombre de redressements n'est pas affecté (*figure 31*). Aucune variation significative de ces paramètres n'est ensuite observée au cours des 2 séances suivantes (*figure 31*).

Tableau 3 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le comportement du rat adulte dans le test de la piscine.

	VEHICULE (n=30)	DIAZEPAM (n=30)	Significativité
Différenciation comportementale			
Plongeurs	19 (63,3 %)	15 (50,0 %)	n.s.
Non Plongeurs	11 (36,7 %)	15 (50,0 %)	(test de Chi2)
Nombre de transports (médiane - quartiles)	6 (5,0-7,0)	7 (3,3-7,8)	n.s. (test de Mann Withney)

D'autre part, les rats qui ont été traités avec le véhicule restent plus longtemps sur la case 12 et se redressent plus souvent que les animaux exposés au DZ lors du 1er essai, ces différences étant significatives (*figure 31*). Au cours des 2 essais suivants, plus aucune modification des paramètres concernant cette case n'a été enregistrée.

Dans le labyrinthe en croix surélevée, le DZ n'induit aucune variation significative de l'ensemble des 12 paramètres mesurés dans ce test, plus particulièrement du nombre total de branches visitées, de la répartition du nombre d'entrées entre les branches ouvertes et fermées et de la durée de station dans chacun des types de bras (*figure 32*).

Dans la boîte à 2 compartiments, la partie riche ne semble pas représenter une enceinte plus attractive que la partie pauvre, les temps passés dans chacun des compartiments, le nombre de transitions et la latence de passage restant identique dans les 2 groupes au cours des 3 jours de test.

Par contre, de la même manière que dans le labyrinthe à 8 branches, les résultats de la boîte à 2 compartiments montrent que l'administration chronique de DZ en période postnatale induit à long terme une désinhibition des animaux dans un environnement qui ne leur est pas familier. Ainsi, dans le compartiment riche, les animaux traités au DZ montrent un attrait beaucoup plus marqué pour l'escalier dès le 1er jour du test alors qu'au cours de la même séance, les rats témoins apparaissent plus émotifs et n'osent pas explorer immédiatement cet escalier. Ils se contentent de rester sur la case 12 qui est au même niveau que celles du reste de la boîte et qui est relativement protégée, entre le coin de la boîte et la première marche de l'escalier

D'autre part, l'allongement de la latence du 1er passage induit par le DZ au second jour de test pose le problème de la motivation exercée par ce test. En effet, le compartiment riche est devenu un milieu familier et l'escalier a été exploré ; il ne représente alors plus une attraction aussi importante que le 1er jour, amenant les animaux exposés au DZ à explorer d'avantage l'ensemble du labyrinthe et à passer plus tardivement du compartiment riche dans le pauvre que les témoins.

Cet effet désinhibiteur du DZ à long terme n'a pu être mise en évidence dans le labyrinthe en croix surélevé. Une hypothèse serait que ce labyrinthe représente un milieu trop aversif par rapport aux effets anxiolytiques supposés de ce traitement pour que ces effets anxiolytiques apparaissent.

Au plan social, le DZ ne confère pas de statut particulier aux animaux lorsqu'ils sont confrontés à des rats traités avec le véhicule dans une situation de contrainte d'accès à la nourriture. Le nombre de rats plongeurs est identique quel que soit le traitement pharmacologique (*tableau 3*). D'autre part, le nombre de transports effectués par les animaux témoins est identique à celui obtenu chez les rats traités au DZ. Ces résultats ne sont que préliminaires. Ils ont été obtenus par l'observation directe des animaux lors de

l'expérimentation et restent à confirmer par le dépouillement des bandes vidéo, notamment pour établir la différenciation entre les ravitailleurs et les autonomes au sein du groupe des transporteurs et les effets du traitement sur cette différenciation.

En conclusion, l'administration chronique précoce de DZ induit, à l'âge adulte, des perturbations comportementales qui sont variables selon le type de test utilisé et qui traduisent essentiellement des modifications de la mémoire et de l'anxiété. Ces résultats sont bien corrélés aux baisses de l'activité fonctionnelle cérébrale observées dans différentes aires corticales, le septum, le thalamus, l'hippocampe et les corps mammillaires (Schroeder et coll., 1994b ; chapitre 4). La plupart de ces structures, dont le rôle dans la mémoire et l'anxiété est connu, sont riches en récepteurs aux BZD dès la naissance (Daval et coll., 1991) et représentent donc une cible potentielle pour le DZ, particulièrement pendant les premiers jours de traitement qui surviennent lors de la phase active de croissance cérébrale. Les effets néfastes de ce traitement sur la maturation du métabolisme énergétique cérébral persistent jusqu'à l'âge adulte avec des conséquences négatives sur le comportement qui découlent sans doute de la baisse de l'activité fonctionnelle qui est observée dans ces régions.

Cependant, le DZ ne semble pas avoir d'effets à long terme sur les capacités d'apprentissage et de mémorisation testées dans le labyrinthe à 8 branches bien que des diminutions de l'ordre de 15 % ont été mises en évidence dans certaines structures impliquées dans la mémoire comme les aires corticales frontales, préfrontales et cingulaires, le thalamus, l'hippocampe (l'aire CA₁ et le gyrus denté), les corps mammillaires et les régions corticales sensorielles qui sont supposées être le lieu de stockage des perceptions sensorielles (Miskin et Appenzeller, 1987). On peut alors poser l'hypothèse que le déficit de 15 % du niveau d'activité fonctionnelle dans une région comme l'hippocampe n'est pas nécessairement le reflet d'un défaut des capacités d'intégration de cette structure et n'est pas suffisant pour induire des perturbations dans les phénomènes de mémorisation qui, de ce fait, n'apparaissent pas dans un test comportemental comme le labyrinthe à 8 branches. Une autre hypothèse serait que les déficits observés dans le labyrinthe en T chez les animaux traités au DZ ne soient pas la conséquence d'une perturbation de la mémoire spatiale mais le reflet d'un manque d'attention et d'une démotivation générée par le traitement dans un test qui est moins attractif que le labyrinthe à 8 branches, phénomène qui a déjà été constaté par Livezey et coll. (1986b). Cependant, il semble nécessaire de confirmer ou non les résultats obtenus dans le labyrinthe en T, notamment en répétant ce test pendant 5 jours consécutifs, avec et sans délai entre les 2 essais.

Le DZ semble avoir un effet anxiolytique à long terme mais qui paraît être modéré par rapport aux observations faites lorsque cette drogue est administrée en traitement aigu ou chronique chez l'animal adulte (Pellow et File, 1986 ; Pellow et coll., 1985 ; Kulkarni et Sharma, 1991 ; Maitre, 1991). Cette désinhibition induite par le DZ se traduit par une augmentation du comportement d'exploration des animaux traités avec cette drogue sans

modification de leur activité locomotrice quand ils sont placés dans un environnement qui ne leur est pas familier et qui est peu aversif comme la boîte à 2 compartiments ou le labyrinthe à 8 branches. Par contre, dans un milieu plus contraignant comme le labyrinthe en croix surélevée ou le test de la "piscine", le niveau émotionnel des animaux traités au DZ paraît comparable à celui des rats témoins. Cette désinhibition est à mettre en relation avec les effets déprimeurs à long terme du DZ qui apparaissent dans des structures limbiques telles que le septum ou les corps mammillaires qui sont connus pour leur rôle dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété (Pesold et Treit, 1992 ; Treit et Pesold, 1990 ; Beracochea et Krazem, 1991). Il est, cependant, à noter que les taux d'UCLG mesurés dans l'amygdale et l'hypothalamus ne sont pas diminués par rapport aux témoins, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effets anxiolytiques observée lorsque les animaux sont placés dans le labyrinthe en croix surélevée ou le dispositif de la "piscine".

L'exposition précoce au DZ est apparue comme étant sans conséquence sur le statut social et le niveau d'anxiété des rats placés dans une situation de contrainte d'accès à la nourriture. Cependant, on peut suspecter que le DZ serait capable de provoquer une différenciation à l'intérieur du groupe des animaux plongeurs vers un statut de transporteurs autonomes, les rats traités avec le véhicule devenant plutôt des transporteurs ravitailleurs. D'une part, dans sept des dix groupes testés, les animaux plongeurs appartiennent indifféremment aux 2 groupes pharmacologiques; une différenciation est donc possible dans cette population de rats plongeurs sous l'action du traitement. D'autre part, il existe une relation directe entre le statut de transporteurs ravitailleurs et le nombre d'attaques subies (Colin et Desor, 1986). Comme l'administration précoce de DZ induit à long terme une augmentation du nombre des interactions sociales et du comportement d'agression envers des animaux provenant d'une autre communauté dans un milieu nouveau (File et Tucker, 1983 ; File, 1986a, 1986c), on peut émettre l'hypothèse que les rats exposés au DZ non-plongeurs inciteraient les animaux traités avec le véhicule à devenir des transporteurs ravitailleurs. Cette hypothèse reste à vérifier par l'analyse détaillée du comportement des animaux dans la cage d'habitation du dispositif sur les enregistrements vidéo.

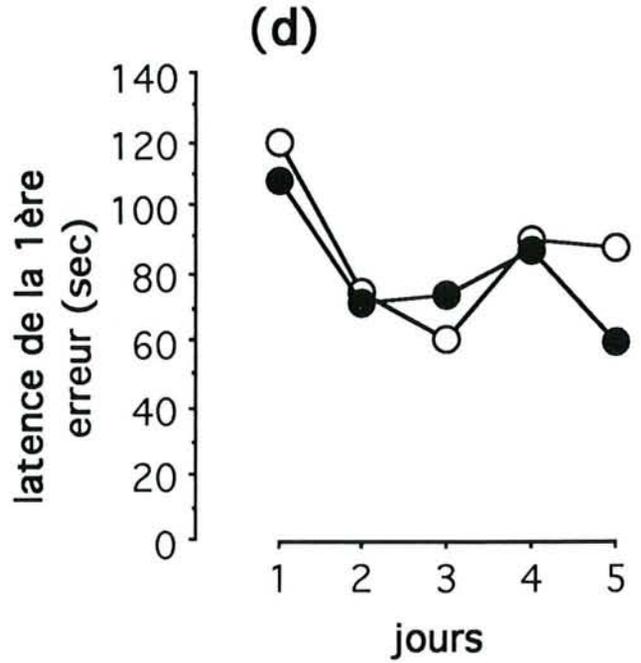
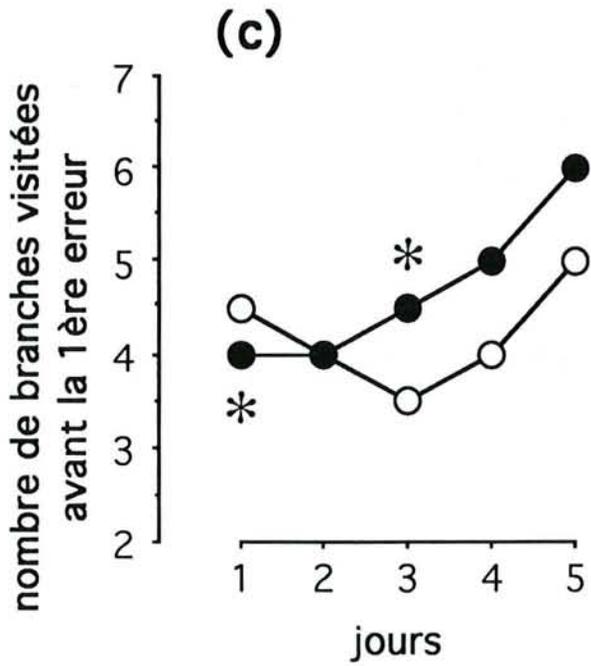
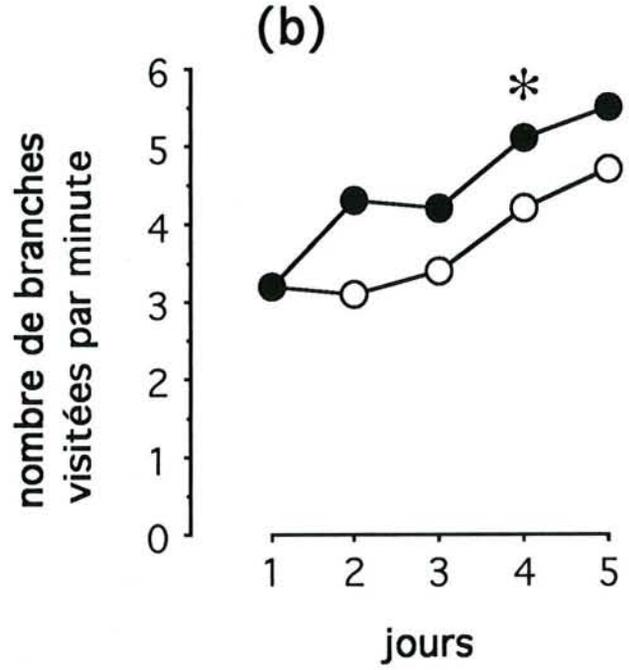
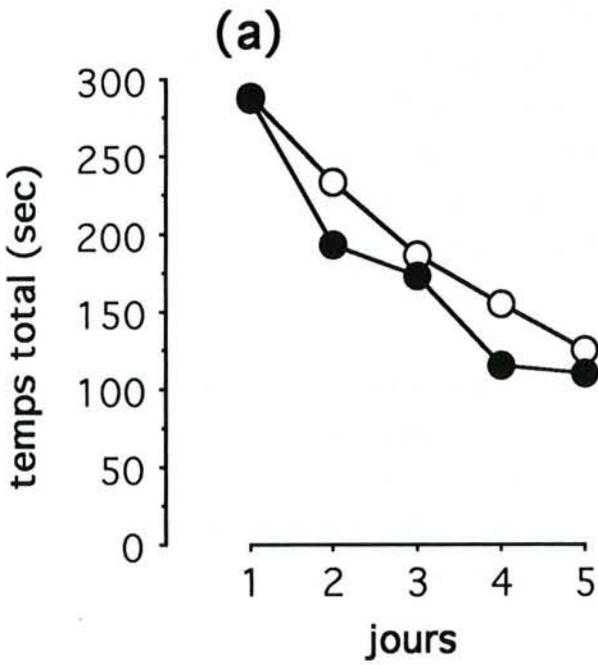
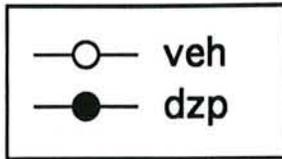
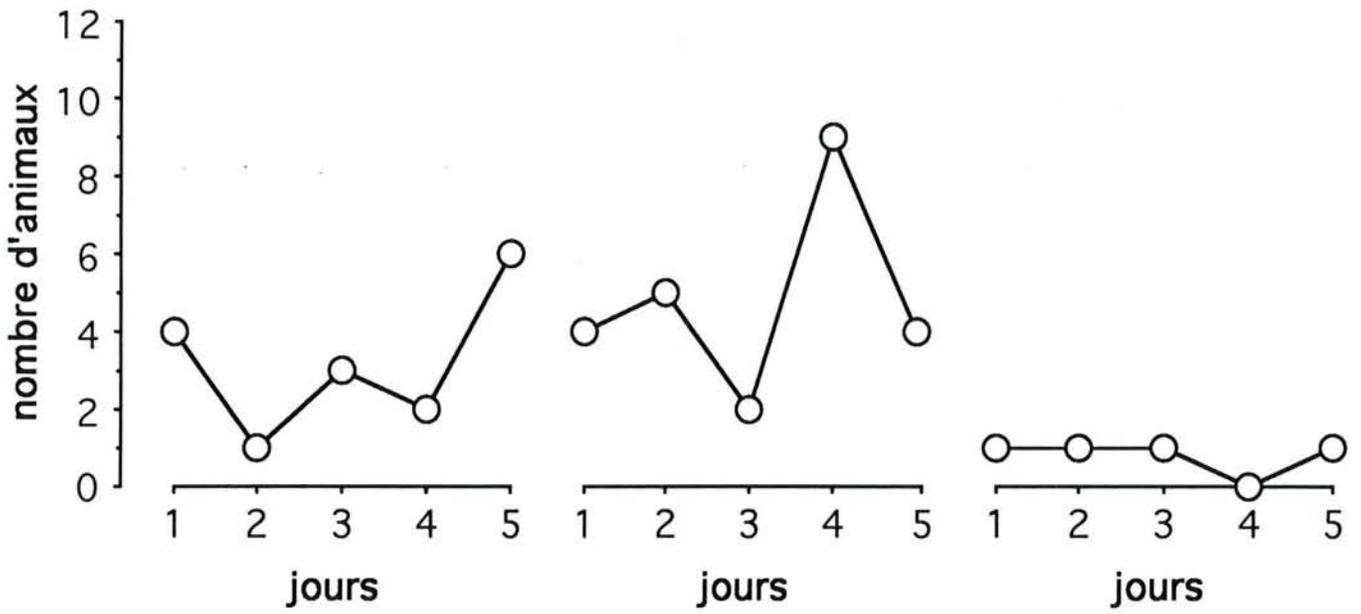


figure 27 :
Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le comportement du rat adulte dans le labyrinthe à 8 branches.

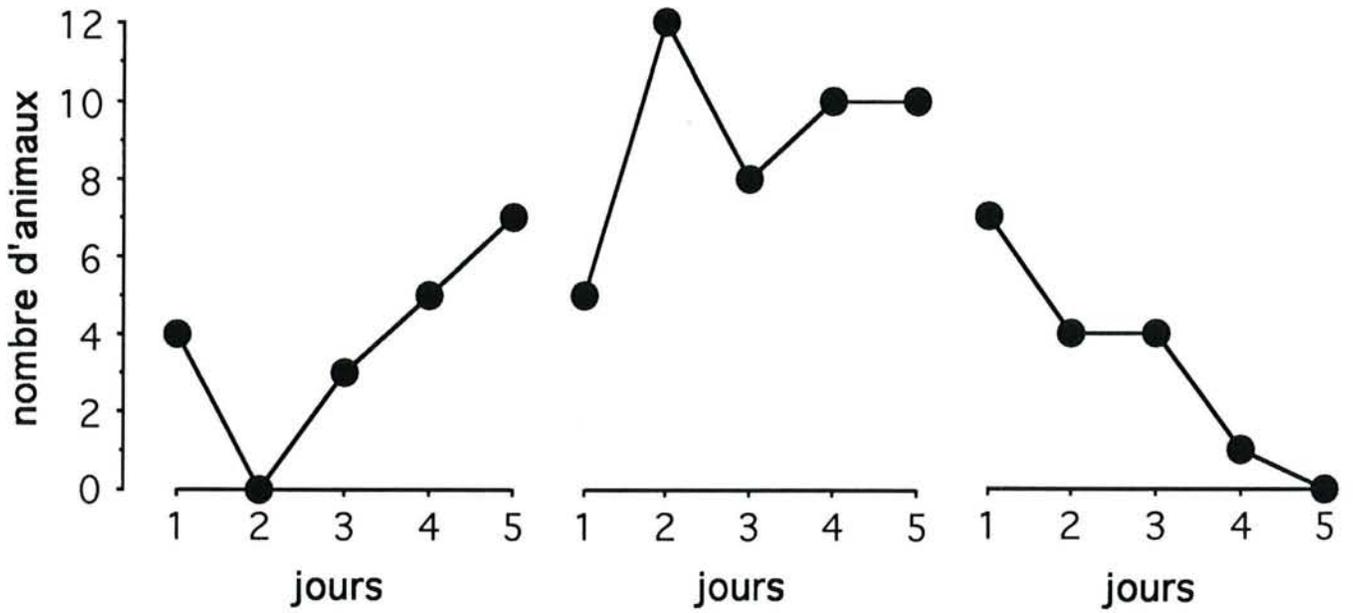
Le diagramme (a) représente les médianes du temps total mis pour réaliser les essais au cours des cinq jours de test chez les rats traités avec le véhicule (veh) et ceux exposés au diazépam (dzp). Le diagramme (b) représente l'activité des animaux dans le labyrinthe, exprimée en nombre de branches visitées par minute. Le diagramme (c) visualise les médianes du nombre de branches visitées avant de faire la 1ère erreur et le diagramme (d) celles du temps de latence de la 1ère erreur.

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux rats traités avec le véhicule (test de Mann-Whitney).

véhicule



diazépam



Stratégie 1

Stratégie 2

Stratégie 3

figure 28 :
Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur les différentes stratégies utilisées par les animaux dans le labyrinthe à 8 branches.

La stratégie 1 consiste à choisir la branche située à 45° de la précédente.
Dans la stratégie 2, le rat choisit la branche située à 90° de la précédente et dans la stratégie 3, celle située à 135° de la précédente.

On considère que le rat développe une stratégie pour explorer le labyrinthe lorsqu'il répète au moins quatre fois le même choix au cours des 8 premiers essais.

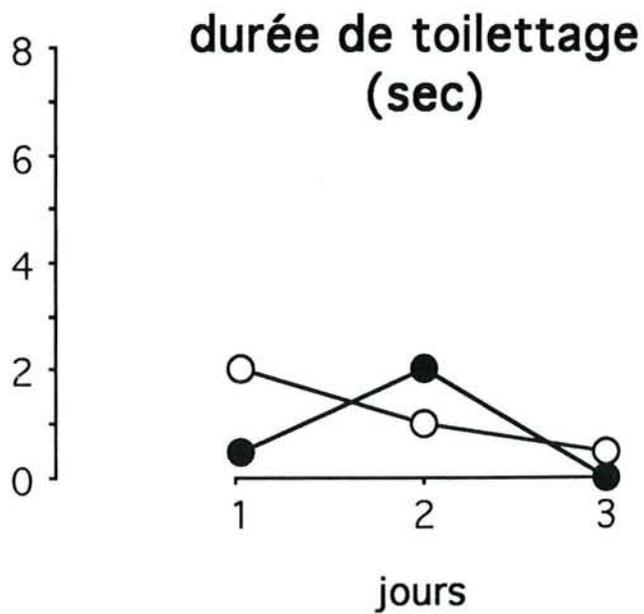
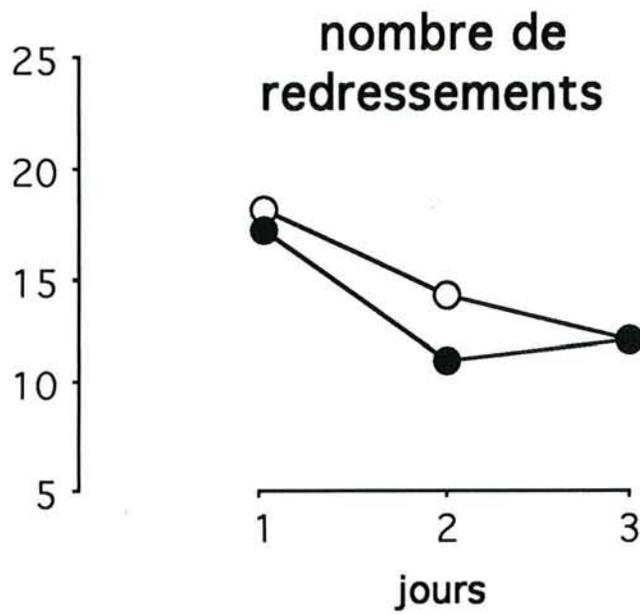
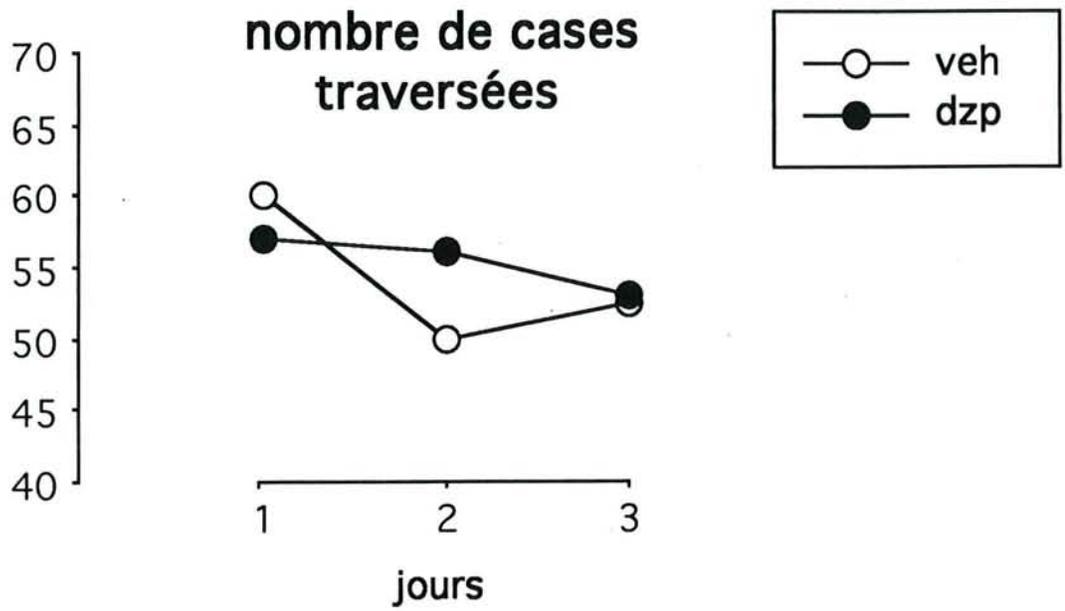


figure 29 :

Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur l'activité locomotrice des animaux traités avec le véhicule (veh) et exposés au diazépam (dzp) dans la boîte à 2 compartiments.

Le diagramme supérieur représente les médianes du nombre total de cases traversées au cours du test pendant 3 jours consécutifs. Le diagramme intermédiaire représente les médianes du nombre de redressements et celui du bas, les médianes de la durée de toilettage.

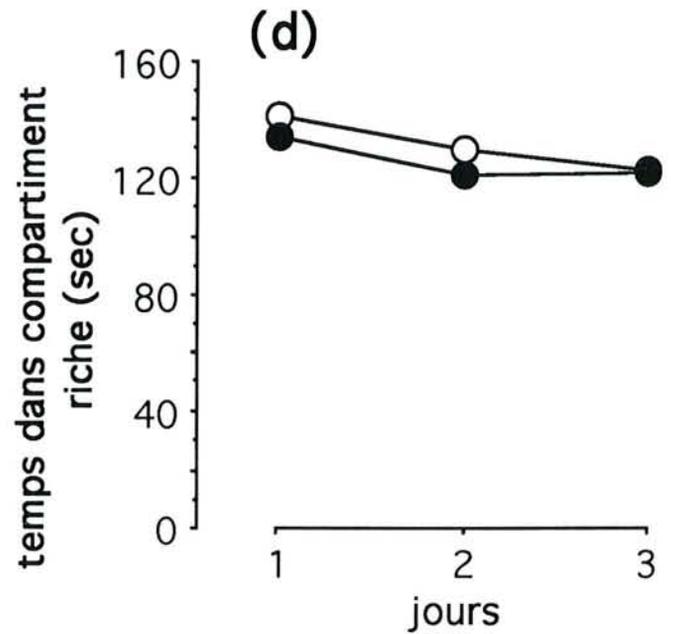
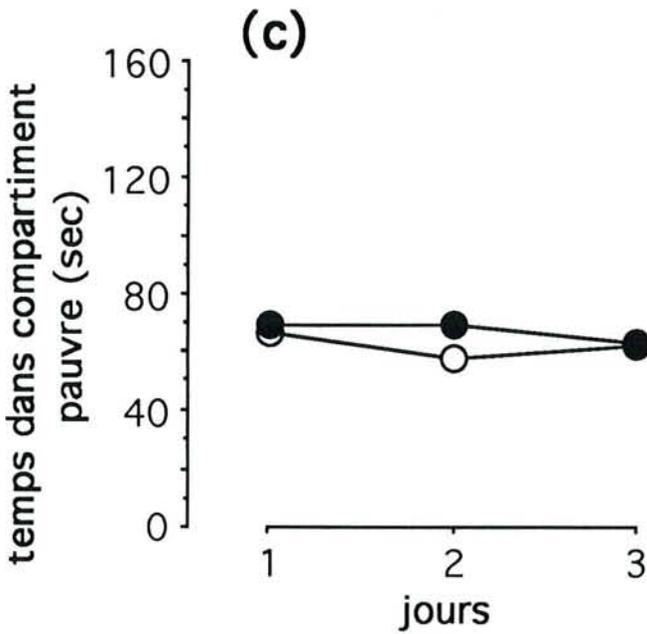
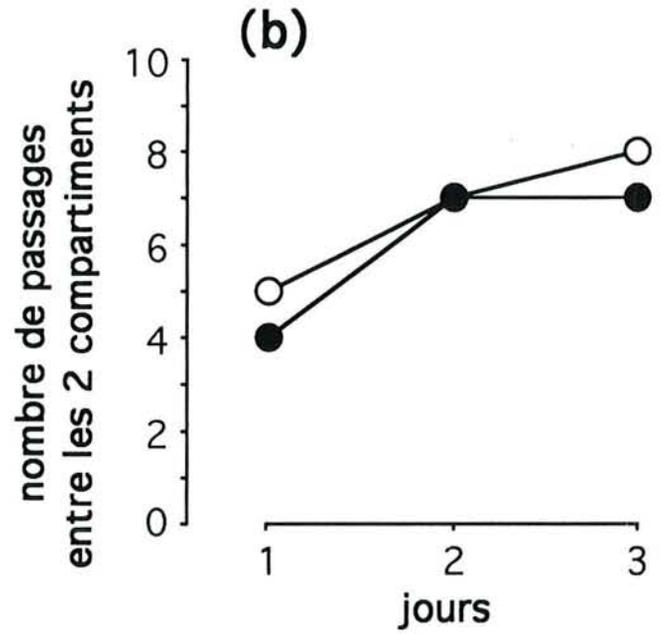
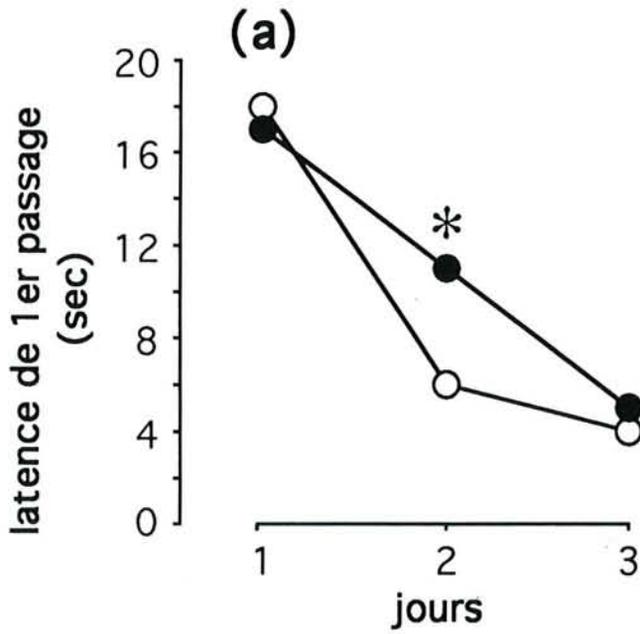
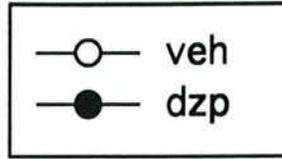
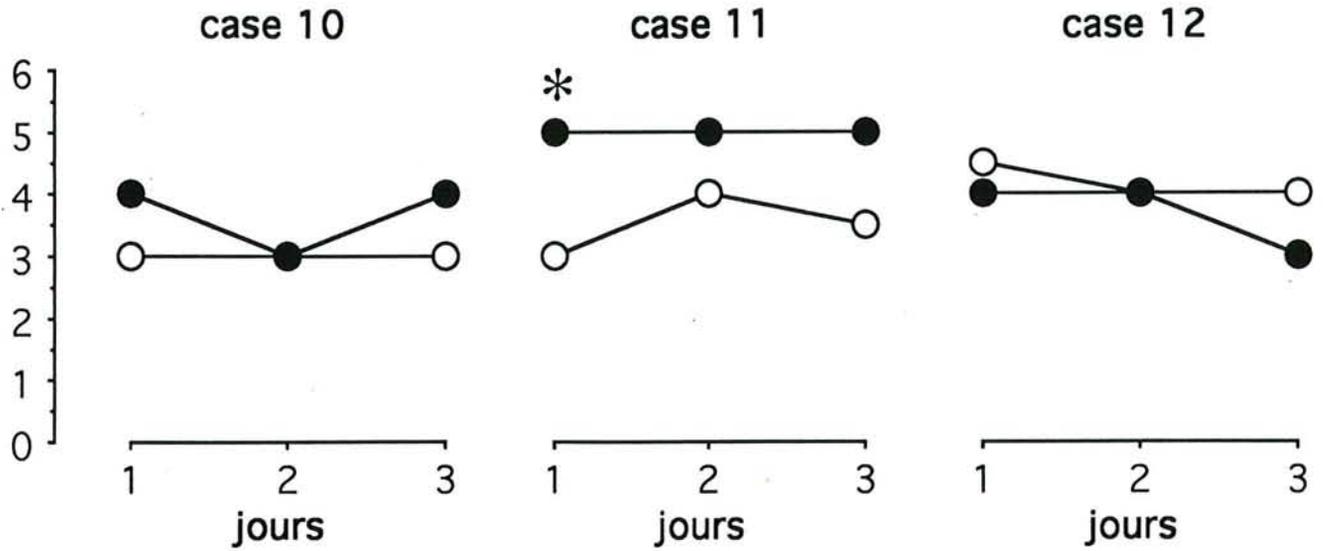


figure 30 :
Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le comportement du rat adulte dans la boîte à 2 compartiments.

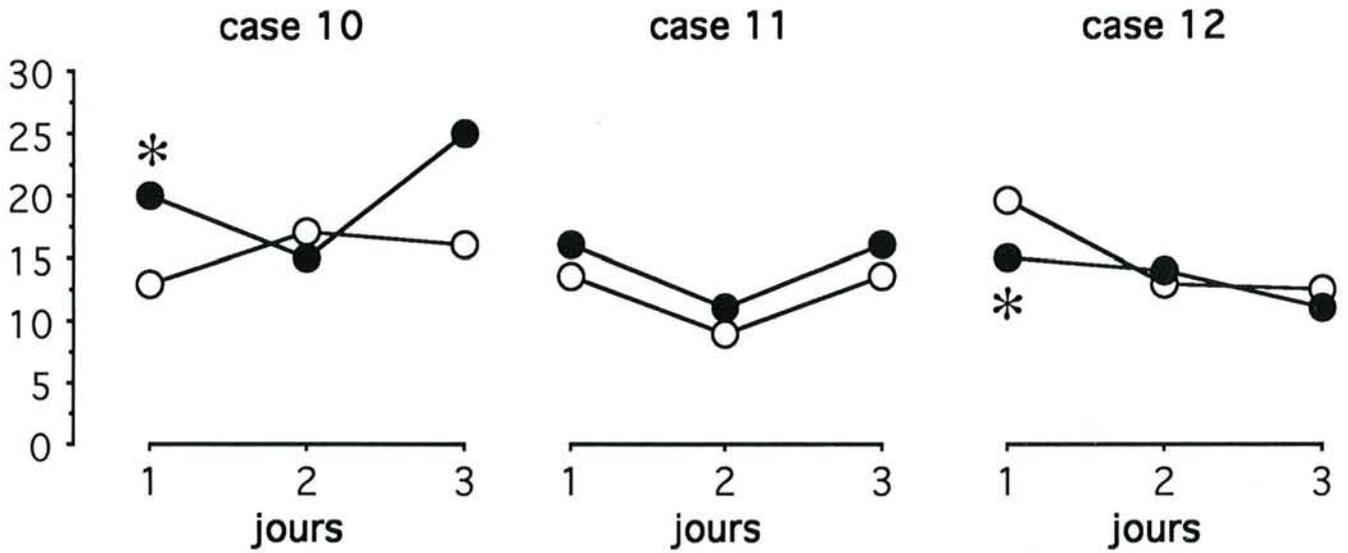
Le diagramme (a) représente les médianes du temps de latence de 1er passage du compartiment pauvre au côté où se trouve l'escalier au cours des trois jours de test chez les rats traités avec le véhicule (veh) et ceux exposés au diazépam (dzp). Le diagramme (b) représente le nombre de transitions effectuées entre les 2 compartiments au cours du test. Les diagrammes (c) et (d) visualisent les médianes du temps total passé, respectivement dans la partie pauvre et la partie riche de la boîte.

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux rats traités avec le véhicule (test de Mann-Whitney).

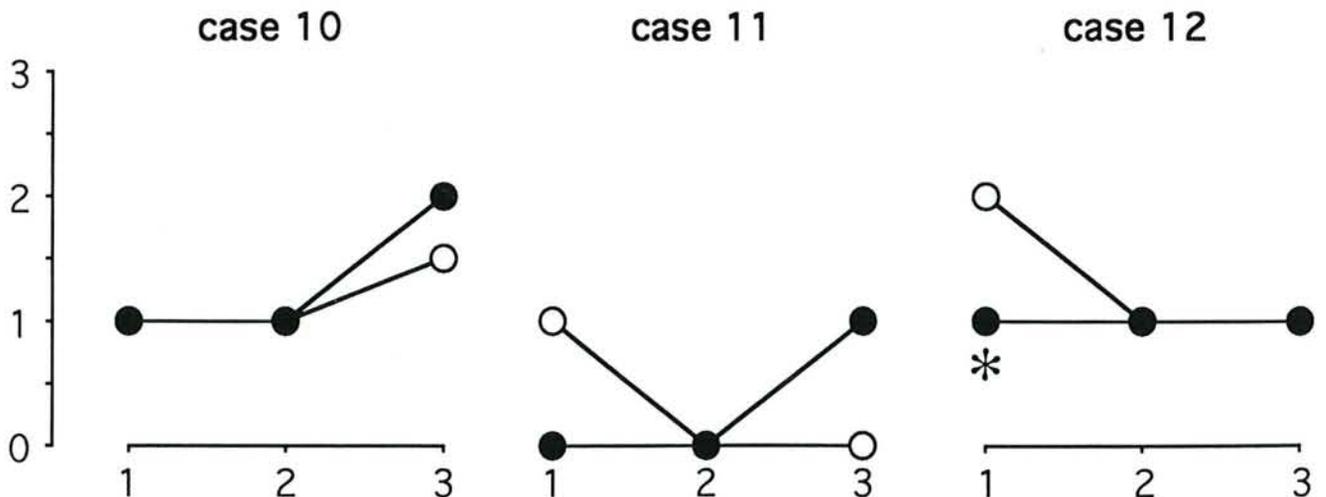
nombre de passages



durée de station (sec)



nombre de redressements



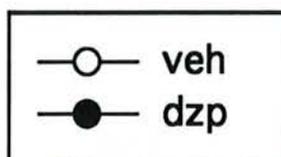
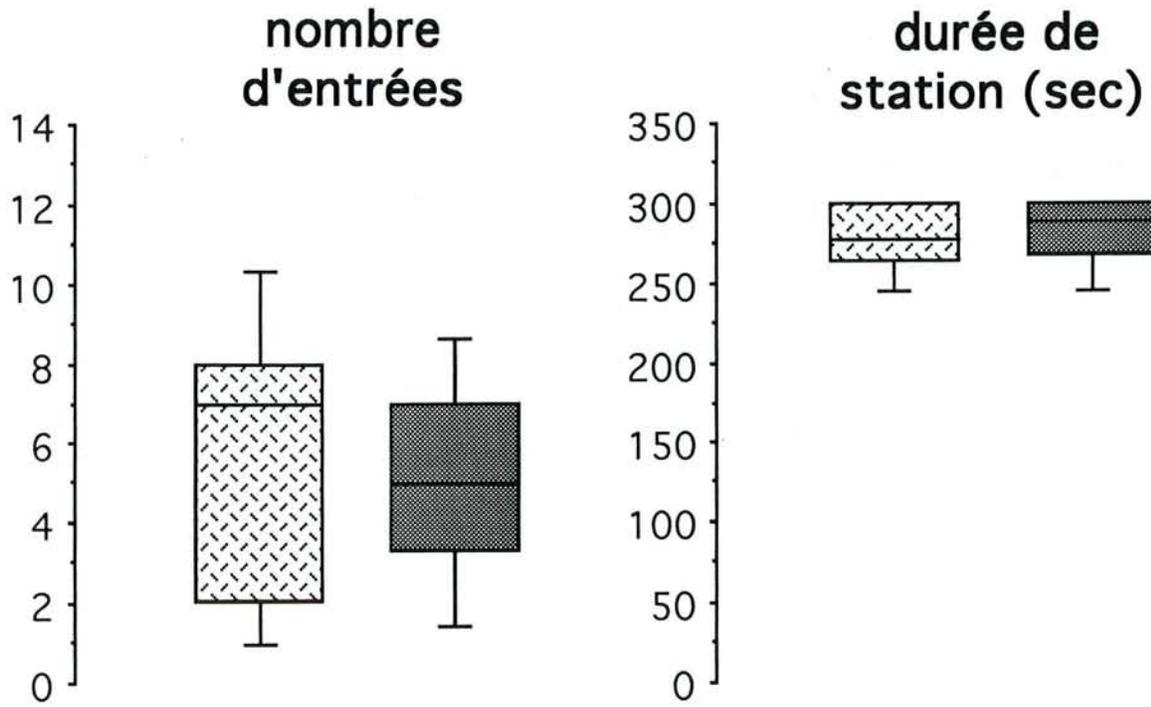


figure 31 :
Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le comportement du rat adulte dans la partie riche de la boîte à 2 compartiments.

Les diagrammes du haut représentent les médianes du nombre de passages sur les cases 10, 11 et 12 (es cases 10 et 11 sont surélevées par rapport aux autres cases de la boîte au cours des trois jours de test chez les rats traités avec le véhicule (veh) et ceux exposés au diazépam (dzp). Les diagrammes intermédiaires représentent les médianes de la durée de station sur chacune des cases et ceux du bas, les médianes du nombre de redressement effectués sur ces mêmes cases.

* $p < 0,05$, différence statistiquement significative par rapport aux rats traités avec le véhicule (test de Mann-Whitney).

branches fermées



branches ouvertes

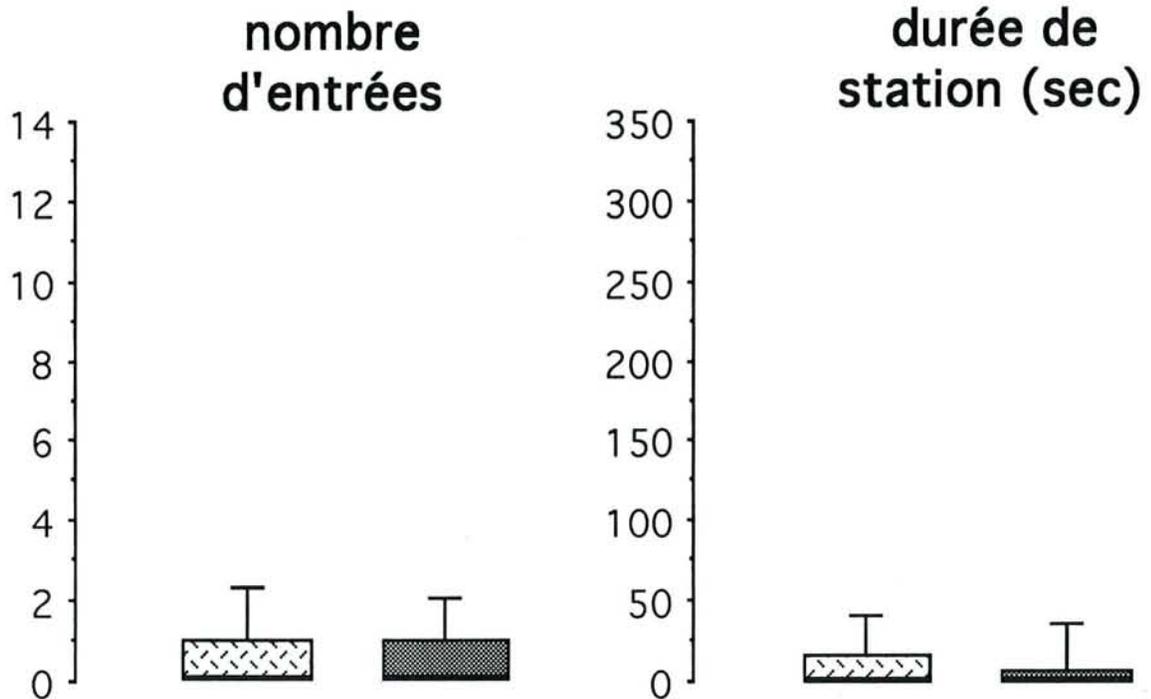


figure 32 :

Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam sur le comportement de rats adultes traités avec le véhicule (veh) et le diazépam (dzp) dans le labyrinthe en croix surélevée.

Les diagrammes du haut représentent les médianes, quartiles et centiles inférieurs et supérieurs du nombre d'entrées et de la durée de station dans les branches fermées.

Les diagrammes du bas visualisent les mêmes paramètres enregistrés dans les branches ouvertes.

DISCUSSION

1. EFFETS DU DIAZEPAM SUR LA CROISSANCE - ROLE DE LA SOUS-NUTRITION

L'administration chronique précoce de DZ induit, dans notre étude, un retard de croissance corporelle de l'ordre de 18 % aux différents stades du développement postnatal étudiés. De plus, ce déficit de la croissance corporelle persiste jusqu'à l'âge adulte.

Ces résultats sont en accord avec les déficits pondéraux observés dans d'autres études qui ont utilisé le DZ (10 mg/kg/jour) (File, 1986a), le lorazépam (2,5 mg/kg/jour) (File, 1986a) ou le clonazépam (0,5 à 5 mg/kg/jour) (File, 1986b ; Wang et Huang, 1990), administrés du 2^{ème} au 21^{ème} jour de vie postnatale chez le rat (File, 1986a, 1986b) ou du 7^{ème} au 28^{ème} jours après la naissance chez la souris (Wang et Huang, 1990). L'administration de CDP chez la souris en période prénatale à la dose de 10 mg/kg/jour induit également une diminution du poids corporel de la descendance qui apparaît au cours des premiers jours de vie postnatale (Pankaj et Brain, 1991). Nos observations confirment également celles qui ont été faites chez l'homme. Ainsi, les enfants nés de mères consommant de manière chronique du lorazépam (5 à 15 mg/jour), du DZ (5 à 30 mg/jour) ou de l'oxazépam (15 à 60 mg/jour), seul ou en association, présentent un poids et une taille à la naissance qui sont plus significativement plus faibles que ceux mesurés dans la population témoin (Laegreid, 1992a).

Le retard de croissance corporelle induit par les BZD administrées en période postnatale peut persister après l'arrêt du traitement jusqu'à des âges compris entre 30 et 35 jours chez le rat (File, 1986a, 1986b), voire même 60 jours dans le cas de notre étude. De même, chez l'homme, le déficit de poids corporel observé à la naissance chez les enfants exposés in utero aux BZD persiste jusqu'à 18 mois de vie postnatale (Laegreid, 1992b).

Cette réduction du poids corporel s'accompagne, dans notre étude, d'une diminution de 7 à 26 % du poids cérébral à tous les stades étudiés, ce qui confirme les résultats obtenus par Wang et Huang (1990) chez la souris. En effet, ces auteurs ont observé une réduction significative de 14 à 25 % du poids de différentes structures cérébrales chez des animaux âgés de 30 jours après un traitement avec du clonazépam (0,5 mg/kg/jour) du 7^{ème} jour au 29^{ème} jour de vie postnatale.

Comme dans le cas du poids corporel, le retard de croissance cérébrale observé au cours du développement chez les rats traités au DZ persiste à long terme. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez les nouveau-nés humains exposés à une prise chronique de

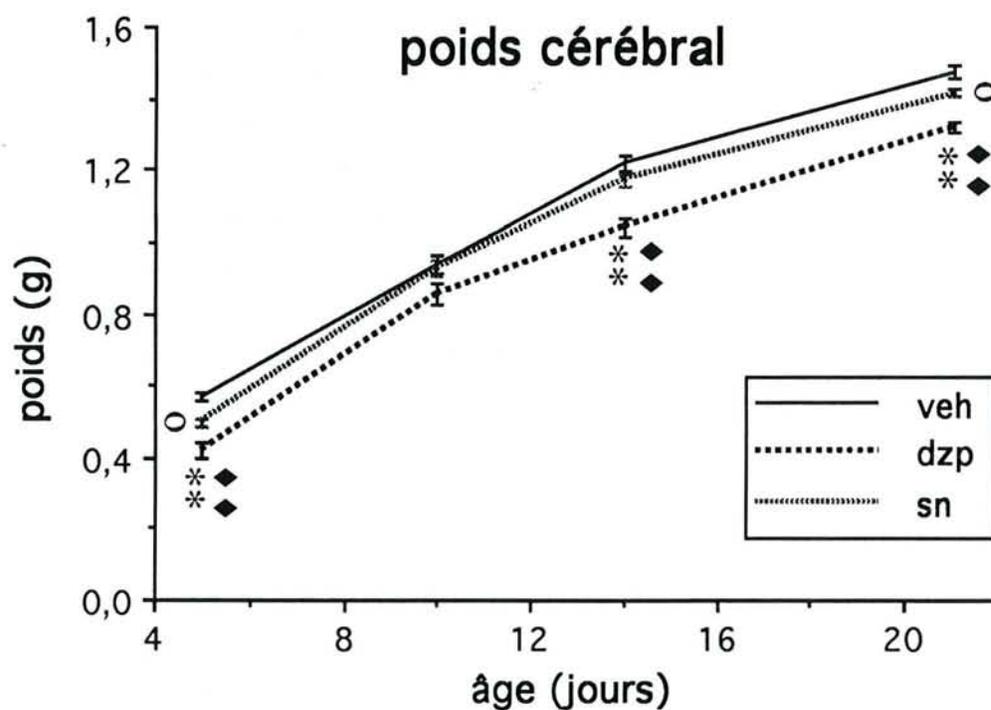
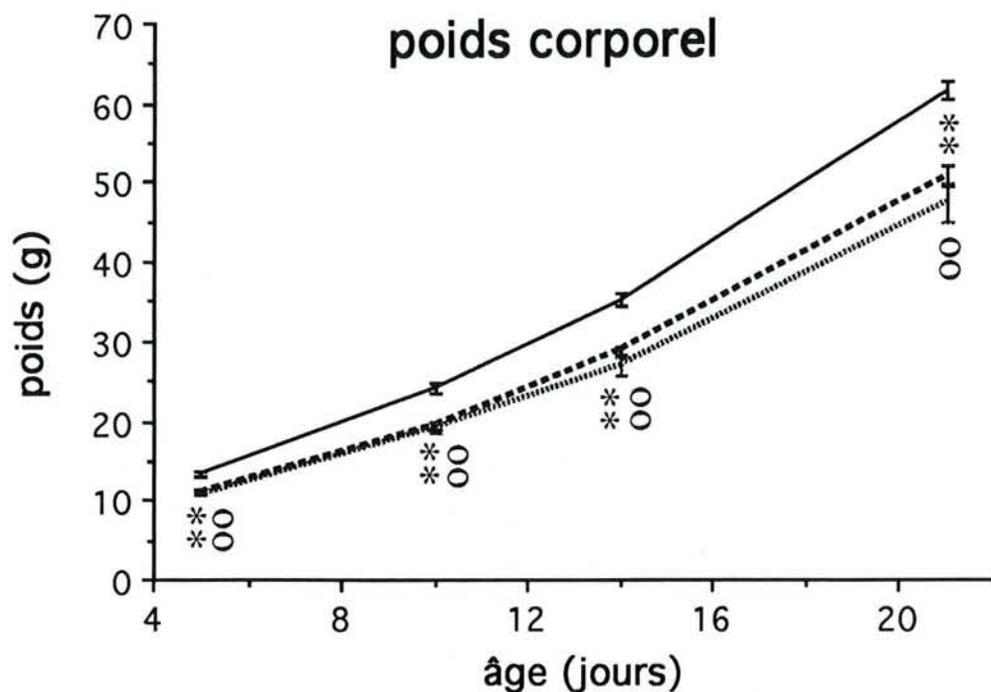


figure 33 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam et d'une sous-nutrition sur l'évolution postnatale des poids corporel et cérébral chez le rat.

Les valeurs, exprimées en g, représentent des moyennes \pm e.s.m. de 10 à 22 portées de 12 animaux chacune pour le poids corporel et de 6 à 10 rats pour le poids cérébral.

** $p < 0,01$, différence statistiquement significative entre les animaux traités avec le véhicule (veh) et ceux exposés au diazépam (dzp) (*t*-test de Bonferroni).

o $p < 0,05$, oo $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre les animaux traités avec le véhicule (veh) et les rats sous-nutris (sn) (*t*-test de Bonferroni).

♦♦ $p < 0,01$, différence statistiquement significative entre les animaux exposés au diazépam et les rats sous-nutris (*t*-test de Bonferroni).

BZD au cours de la grossesse. Ces enfants présentent, à la naissance, un périmètre crânien plus petit que celui mesuré dans la population témoin (Laegreid et coll., 1992a). De plus, ce retard est toujours observé à l'âge de 18 mois dans des proportions comparables à celles de la naissance (Laegreid et coll., 1992b).

Il a été démontré chez le rat adulte que le retard de croissance corporelle dû à un traitement chronique aux BZD est accompagné d'une hypophagie (Grimm et Jancourt, 1983) alors qu'au contraire, une administration aiguë de BZD induit chez l'animal une hyperphagie dose-dépendante et réversible après injection d'antagonistes ou d'agonistes inverses des récepteurs aux BZD (Cooper, 1985, 1986), démontrant que les BZD peuvent moduler le comportement alimentaire de l'animal. Il est donc possible que dans notre étude, les baisses de poids corporel et cérébral soient, du moins en partie, liées à ce phénomène.

D'autre part, ces réductions de poids corporel et cérébral peuvent être la conséquence d'une sous-nutrition liée à l'effet sédatif du DZ. Ainsi, l'injection de DZ induit chez les animaux une sédation qui peut durer plusieurs heures au cours desquelles ils ne s'alimentent pas avec pour conséquence une sous-alimentation et un retard de croissance. L'observation des animaux au cours du traitement montre que la durée de cette sédation va en diminuant avec l'âge, notamment après le 14^{ème} jour de vie postnatale, ce qui pourrait refléter le développement d'une tolérance et/ou la diminution des taux plasmatiques et cérébraux de DZ observée au cours de la même période. De plus, il n'y a plus d'aggravation de l'écart entre les poids corporel et cérébral observés chez les animaux traités au DZ et ceux mesurés chez les témoins après 14 jours, ce qui pourrait également traduire l'apparition de cette tolérance. Cependant, le DZ induit toujours une réduction des poids corporel et cérébral après 14 jours, ce qui suggère que ces retards de croissance seraient d'avantage dus à un effet direct du DZ qu'à un effet lié à la sous-alimentation des animaux. De plus, comme nous le discuterons dans le chapitre suivant, cette hypothèse d'un effet direct du DZ sur la maturation cérébrale est confirmée par les résultats des concentrations sanguines de glucose et des composés cétoniques qui ont été mesurées dans les 3 groupes d'animaux.

Ces hypothèses ont été confirmées par d'autres résultats de notre étude. Ainsi, une sous-alimentation survenant au cours des 3 premières semaines de vie postnatale et provoquant une baisse du poids corporel par rapport aux témoins comparable à celle observée chez les animaux traités au DZ (*figure 33*), n'induit que des modifications mineures du poids du cerveau par rapport à celles provoquées par l'administration de DZ (*figure 33*).

Ces données confirment d'une part, que le cerveau est préservé, en terme de croissance pondérale, par rapport à d'autres organes comme le foie ou le rein dans le cas d'une sous-nutrition (Smart, 1991), ce qui est également observé dans un modèle expérimental de retard de croissance intra-utérin développé dans notre laboratoire (Van Wallegghem, 1993). D'autre part, elles montrent que les effets du DZ sur la croissance cérébrale sont bien liés à un effet

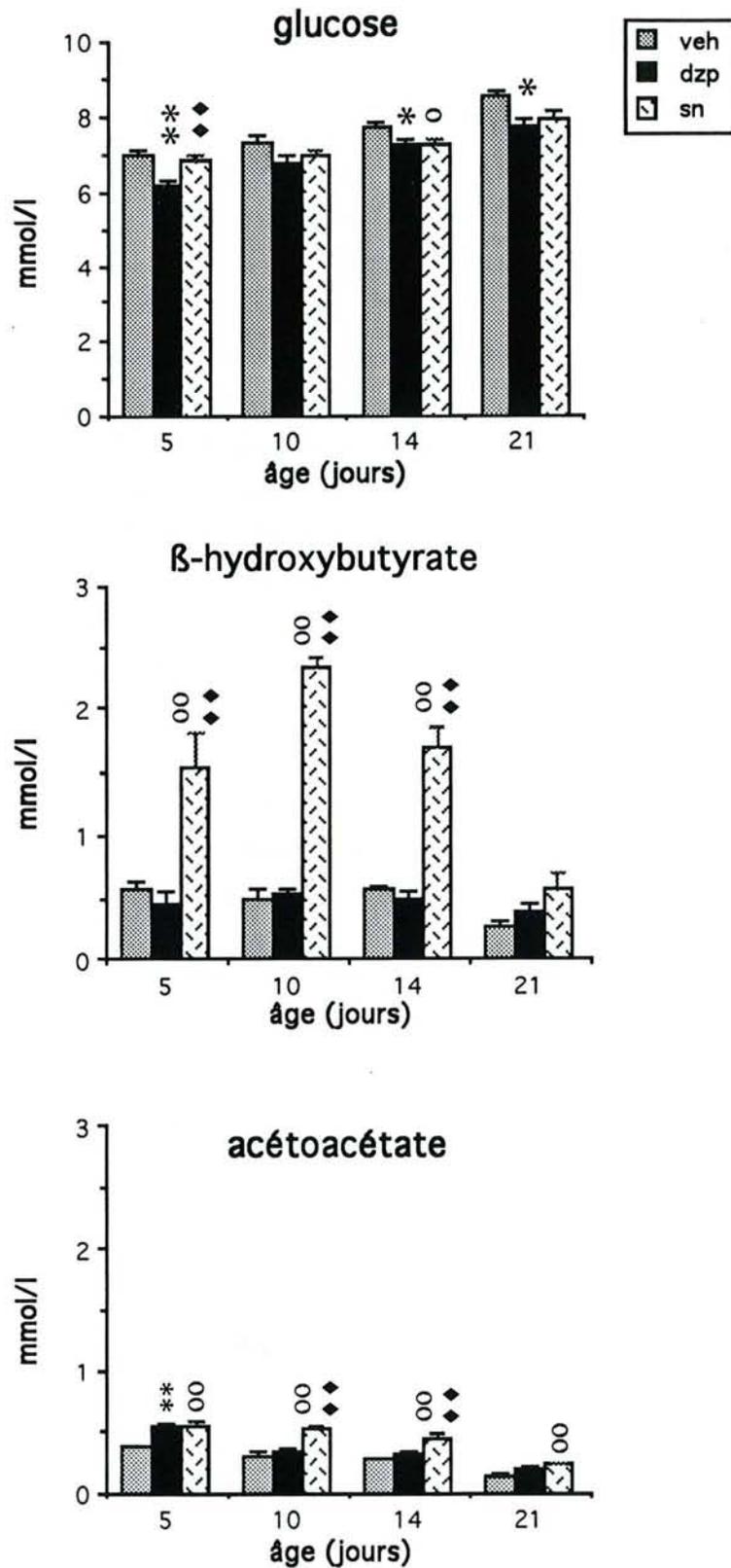


figure 34 : Effets d'un traitement chronique précoce au diazépam et d'une sous-nutrition sur l'évolution postnatale des concentrations circulantes de glucose, β-hydroxybutyrate et d'acétoacétate chez le rat.

Les valeurs, exprimées en mmol/l, représentent des moyennes ± e.s.m. de 4 à 10 animaux.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre les animaux traités avec le véhicule (veh) et ceux exposés au diazépam (dzp) (*t*-test de Bonferroni).

o $p < 0,05$, oo $p < 0,01$, différences statistiquement significatives entre les animaux traités avec le véhicule (veh) et les rats sous-nutris (sn) (*t*-test de Bonferroni).

♦♦ $p < 0,01$, différence statistiquement significative entre les animaux exposés au diazépam et les rats sous-nutris (*t*-test de Bonferroni).

direct de cette molécule et non la conséquence d'une sous-nutrition reliée à la sédation induite par le DZ.

2. EFFETS A COURT TERME DU DIAZEPAM SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL ET LE COMPORTEMENT

2.1. Concentrations circulantes de glucose et des composés cétoniques

Dans notre modèle, le DZ induit une diminution de la glycémie à chacun des stades étudiés alors que les taux circulants de β HB et d'ACA ne sont pas modifiés.

A l'inverse, la sous-nutrition ne modifie pas les taux plasmatiques de glucose alors les concentrations de β HB et d'ACA sont multipliées par 2 ou 3 par rapport à celles mesurées chez les témoins ou les animaux exposés au DZ (*figure 34*). Cet état de cétose caractéristique est classiquement décrit dans tout problème de sous-nutrition ou de jeûne dans différentes espèces (Flecknell et Wooton, 1989 ; Hawkins et coll., 1971 ; Kraus et coll., 1974 ; Owen et coll., 1967 ; Persson et coll., 1972).

Les effets opposés du DZ et de la sous-nutrition sur les taux circulants de glucose et des composés cétoniques confirment l'idée que les conséquences du traitement au DZ sont bien directes et non liées à une sous-alimentation consécutive aux propriétés sédatives de cette molécule.

L'hypoglycémie observée chez les animaux traités au DZ est sans doute liée à la sédation transitoire qu'induit cette drogue dans les deux ou trois premières heures qui suivent son administration et qui correspond au moment où sont faits les prélèvements. De la même manière, l'administration chronique de PhB provoque une hypoglycémie alors que les échantillons sanguins sont recueillis dans les heures qui suivent l'application du traitement et qui correspondent à une période de sédation induite par le traitement (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987), ce qui confirme les observations faites avec le DZ dans notre étude.

D'autre part, le fait que les endozépines, en agissant comme un agoniste inverse du DZ au niveau des récepteurs périphériques des BZD, diminuent la libération d'insuline induite par le glucose dans une préparation de pancréas isolé (Chen et coll., 1988), laisse à penser que le DZ, en se fixant sur les récepteurs périphériques pourrait favoriser une hypoglycémie en augmentant la libération d'insuline au niveau pancréatique.

2.2. Biosynthèse des acides aminés cérébraux

2.2.1. Incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux

Les résultats de notre étude montrent que la radioactivité mesurée dans la fraction cérébrale des acides aminés après injection de glucose-(2-¹⁴C) est significativement plus faible chez les animaux traités au DZ que chez les témoins à 5 et 10 jours de vie postnatale et que celle de la fraction du glucose non transformé est plus élevée aux mêmes stades.

Ces résultats font donc apparaître aux stades les plus précoces du développement postnatal une réduction de l'utilisation du glucose en tant que précurseur de la biosynthèse des acides aminés cérébraux qui est une caractéristique fondamentale du métabolisme cérébral de l'animal adulte (Gaitonde et coll., 1965 ; Vrba et coll., 1962) . Ce phénomène est également constaté jusqu'au 14^{ème} jour après la naissance dans le cas de l'administration chronique de PhB chez le rat au cours de la même période (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987).

Ces résultats sont en accord avec la dépression du métabolisme oxydatif du glucose qui est observée dans le cerveau chez des animaux anesthésiés avec des barbituriques et qui résulte de l'inhibition de la phosphofructokinase, une des enzymes clé de la glycolyse (Chapman et coll., 1978 ; Crane et coll., 1978 ; Nilsson et Siesjö, 1974 ; Strang et Bachelard, 1973). De même, l'injection aiguë de DZ (4 mg/kg) chez le rat adulte a pour conséquence une augmentation des concentrations cérébrales de glucose et de fructose-1,6-diphosphate sans qu'il y ait modification des taux de G6P et de fructose-6-phosphate (Gey, 1973 ; Young et coll., 1969), montrant ainsi que les premières étapes de la glycolyse ne sont pas perturbées par le DZ et restent fonctionnelles, notamment pour prévenir toute accumulation de fructose-1,6-diphosphate caractéristique de certains dégâts cellulaires (Balázs, 1970). Ces résultats, ainsi que ceux de notre étude, semblent indiquer que les BZD induisent plutôt une augmentation du prélèvement cérébral de glucose qu'une dépression de la glycolyse. Un prélèvement accru de glucose par le cerveau a été également observée dans l'étude de la différence artério-veineuse cérébrale de glucose chez des rats âgés de 10 et 21 jours et traités chroniquement avec du PhB au cours de la période postnatale (Schroeder et coll., 1991).

La radioactivité mesurée dans la fraction des acides carboxyliques ne varie pas au cours du développement postnatal chez les animaux traités au DZ. De la même façon, l'administration aiguë de DZ n'induit aucune modification significative des taux cérébraux de lactate, pyruvate et malate (Gey, 1973). Ces résultats suggèrent que le retard de l'incorporation du carbone du glucose observé avec le DZ pourrait résulter d'une dépression des voies de synthèse des acides aminés associées au cycle de Krebs. Il est également à noter que l'activité des enzymes associées au métabolisme du glucose restent relativement faibles

chez l'animal immature et ne deviennent comparables à celles observées chez l'adulte qu'entre 25 et 35 jours de vie postnatale (Bilger et Nehlig, 1991, 1992 ; Leong et Clark, 1984a, 1984b)

A 14 et 21 jours, la distribution de la radioactivité entre les différentes fractions de l'extrait cérébral est la même chez les animaux traités au DZ que chez les rats témoins ainsi que l'ont déjà observé Pereira de Vasconcelos et Nehlig (1987) dans le cas d'un traitement chronique précoce au PhB. Ces résultats peuvent être le reflet d'une tolérance au DZ, phénomène qui est couramment décrit pour les BZD (Gallager et coll., 1991), et/ou de la diminution de près de 50 % des taux plasmatiques et cérébraux de DZ entre 10 et 14 jours (Schroeder et coll., 1994a ; chapitre 2) comme dans le cas du PhB (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987).

2.2.2. Métabolisme des acides aminés cérébraux

a) concentrations cérébrales des acides aminés

L'administration chronique précoce de DZ ne provoque que peu de modifications des concentrations tissulaires d'acides aminés mesurées dans différentes régions du cerveau, à l'exception d'une augmentation significative des taux de leucine, sérine, thréonine, glycine, glutamine et GABA à 5 et 10 jours de vie postnatale dans le cervelet. De plus, la concentration cérébrale de GABA mesurée dans cette structure chez les animaux traités au DZ reste supérieure à celle observée chez les témoins à 14 et 21 jours de vie postnatale.

Ces résultats sont en contradiction avec ceux de Hannah et coll. (1989) qui mettent en évidence une diminution des taux cérébraux d'aspartate, glutamate, GABA et glycine dans le cervelet de rats âgés de 7 jours et traités quotidiennement avec du clonazépam (100 µg/kg/jour) entre le 10ème jour de gestation et le 21ème jour après la naissance. Par contre, un accroissement de la libération de GABA a été observé dans l'hippocampe chez le rat adulte soumis à un traitement chronique au DZ (Hittchcott et coll., 1990).

L'augmentation des concentrations de GABA et de glutamine entre 10 et 21 jours de vie postnatale dans le cervelet des animaux exposés au DZ sans qu'il y ait modification de celle du glutamate indique que la voie de synthèse du GABA est fonctionnelle et n'est pas affectée par le traitement. De plus, ces résultats suggèrent que l'exposition au DZ n'a pas de conséquences sur les populations cellulaires responsables de la production de ce neuromédiateur dans cette structure, à savoir les cellules de Purkinje, les cellules en panier et les neurones stellaires (Schulman, 1983).

Par contre, ces perturbations induites par le DZ correspondent à la période où les animaux commencent à manifester une accoutumance au traitement ainsi qu'à l'apparition dans le cervelet des récepteurs aux BZD de type I (Bacon et coll., 1991 ; Chisholm et coll.,

1983 ; Garrett et Tabakoff, 1985 ; Lippa et coll., 1981). Or, il est maintenant admis que la tolérance aux BZD est liée à une diminution de la sensibilité des neurones à l'action du GABA qui est plus ou moins marquée selon la durée de l'exposition (Gallager et coll., 1991). Ainsi, en mesurant le flux d'ions $^{36}\text{Cl}^-$ en présence de GABA dans des préparations membranaires de cortex de rat, Marley et Gallager (1989) ont observé que le DZ est capable de diminuer cet influx et ce, de manière dose-dépendante.

Dans notre étude, le DZ provoque une augmentation de la concentration cérébrale de GABA dans le cervelet entre 10 et 21 jours. Cette augmentation du taux cérébral de GABA pourrait être le reflet de la tolérance au DZ qui apparaît au cours de la même période. Cette tolérance étant due à une désensibilisation des neurones à l'action du GABA, il est possible que le cerveau produise du GABA en quantité plus importante pour que ce neuromédiateur puisse continuer à exercer son rôle physiologique de régulation. Ce mécanisme ne serait visible que dans le cervelet du fait de la maturation plus tardive de cette structure par rapport aux centres supérieurs du SNC (Altman, 1982).

b) radioactivités spécifiques - flux dans les différentes voies de synthèse des acides aminés

Quel que soit la traceur radioactif injecté, le DZ n'induit aucune modification de la répartition du marquage entre l'aspartate, la glutamine, le glutamate et le GABA à tous les stades étudiés, à l'exception d'une augmentation du pourcentage de radioactivité de la glutamine à partir du glucose-(2- ^{14}C) à 5 et 10 jours de vie postnatale dans les 3 structures étudiées et d'une baisse concomitante du marquage de cet acide aminé avec le βHB -(3- ^{14}C) comme précurseur aux mêmes âges et dans les mêmes structures. Or, le βHB est un substrat 2 à 3 fois plus actif que le glucose pour la synthèse des acides aminés pendant les deux premières semaines du développement postnatal (DeVivo et coll., 1973, 1975). Il semble donc que le DZ induise une diminution de l'utilisation du βHB pour la synthèse de la glutamine qui est compensée par une utilisation accrue du glucose en tant que précurseur sans qu'il y ait de répercussion négative dans la concentration cérébrale de cet acide aminé.

Les radioactivités spécifiques des différents acides aminés, qui sont le reflet du taux de renouvellement du pool cérébral d'acides aminés (Fonnum, 1985), ne sont pas affectées par l'exposition au DZ après injection de glucose-(2- ^{14}C) ou de βHB -(3- ^{14}C) à 5 jours de vie postnatale, âge où les voies métaboliques des acides aminés ne sont pas encore très actives (Gaitonde et Richter, 1966).

A 10 et 14 jours, le DZ induit une diminution des radioactivités spécifiques avec le glucose-(2- ^{14}C) comme précurseur, ce qui met en évidence une moindre efficacité des voies de synthèse des acides aminés à partir du glucose. Ce phénomène est également observé avec l'utilisation des barbituriques à dose anesthésiante (Yoshino et Elliott, 1969) ou

l'administration chronique de PhB (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987). Par contre, après injection de β HB-(3- 14 C), les radioactivités spécifiques sont augmentées chez les animaux traités au DZ, montrant que la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du β HB est plus active après exposition au DZ, comme cela a déjà été observé avec le PhB (Pereira de Vasconcelos et coll., 1987).

A 21 jours de vie postnatale, des effets inverses ont été observés. Le DZ induit une augmentation significative des radioactivités spécifiques des acides aminés après injection de glucose-(2- 14 C) alors que celles mesurées à partir du β HB-(3- 14 C) ne sont pas modifiées. Cette brusque augmentation de l'activité des voies de synthèse des acides aminés cérébraux qui utilisent le glucose comme substrat pourrait être le reflet de la tolérance au DZ et/ou de la baisse des taux circulants et cérébraux de DZ entre 14 et 21 jours (Schroeder et coll., 1994a). De la même façon, Hannah et coll. (1989) ont observé que les concentrations cérébrales d'acides aminés mesurées dans le cervelet de rat après 3 semaines de traitement avec du clonazépam sont identiques à celles des témoins, à l'exception de celle du GABA qui reste diminuée.

En conclusion, l'administration chronique de DZ en période postnatale diminue l'incorporation du carbone du glucose dans les acides aminés cérébraux uniquement aux stades les plus immatures du développement sans qu'il y ait de conséquences sur les concentrations cérébrales des acides aminés. Les effets métaboliques du DZ semblent donc moins importants que ceux observés avec le PhB et suggèrent que le DZ serait moins toxique que le PhB quant il est utilisé en période postnatale. En effet, le DZ ne semble capable d'induire des dommages cellulaires que lorsqu'il est administré en période prénatale, c'est-à-dire pendant la période de différenciation neuronale (Frieder et coll., 1984b). Par contre, le PhB peut à la fois perturber les processus de différenciation neuronale et détruire des neurones déjà formés (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et coll., 1979).

2.3. Utilisation cérébrale locale de glucose

Les résultats de notre étude font apparaître une baisse significative de l'UCLG dans 13, 48 et 23 structures aux âges respectifs de 10, 14 et 21 jours de vie postnatale. A l'heure actuelle, aucune étude n'a abordé les effets d'une exposition chronique précoce au DZ sur l'utilisation régionale cérébrale de glucose chez le rat immature.

Par contre, les conséquences de l'administration aiguë ou chronique de DZ sur les taux régionaux d'utilisation de glucose ont été étudiées chez l'animal adulte. En fonction de la dose injectée (0,1 à 2,5 mg/kg), le DZ induit des baisses significatives de l'UCLG dans un nombre variable de structures (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Nehlig et coll., 1987). L'administration subchronique ou chronique de DZ induit également une dépression de l'activité fonctionnelle cérébrale mais dans un nombre plus limité de structures par rapport à

un traitement aigu (Ableitner et coll., 1985 ; Laurie et Pratt, 1989), ce qui met en évidence le développement d'une tolérance au traitement.

A 10 et 14 jours de vie postnatale, le métabolisme cérébral est déprimé uniquement dans des structures postérieures telles que certaines aires auditives qui sont matures très tôt et qui présentent à ces stades un niveau de métabolisme plus élevé que les autres territoires cérébraux (Nehlig et coll., 1988). De la même façon, Suda et coll. (1990) ont observé chez l'animal adulte que les régions où les taux d'UCLG sont parmi les plus élevés de l'ensemble du SNC, ce qui est le cas des structures auditives, sont les plus sensibles à une hypoglycémie et semblent ainsi particulièrement fragiles.

Cependant, c'est au stade de 14 jours, au cours de la phase de croissance active du cerveau qui est caractérisée par la maturation des neurones, la prolifération des cellules gliales, l'élongation et la myélinisation des axones et des dendrites et la synaptogénèse (Dobbing, 1971 ; Morgane et coll., 1992 ; Rodier, 1980 ; Smart, 1991) que le DZ induit une dépression massive des taux d'utilisation de glucose dans 73 % des structures étudiées.

A 21 jours de vie postnatale, le nombre de structures dont l'activité fonctionnelle est déprimée par le DZ est réduit de plus de 50 % par rapport au stade de 14 jours, reflétant, comme cela a déjà été suggéré dans l'étude de la biosynthèse des acides aminés cérébraux, une tolérance vis-à-vis du traitement et/ou la diminution importante des concentrations plasmatiques et cérébrales de DZ entre 14 et 21 jours (Schroeder et coll., 1994a).

De nombreuses études ont rapporté une accoutumance aux effets sédatifs (Lister et coll., 1983), anticonvulsivants (Garratt et coll., 1988 ; Gonsalves et Gallagher, 1987) et anxiolytiques (Davis et Gallagher, 1988 ; File, 1985) des BZD après une exposition prolongée. Il est maintenant admis que la diminution de la sensibilité des neurones à l'action du GABA est à la base de ce phénomène de tolérance (Gallagher et coll., 1991). L'apparition de cette tolérance s'accompagne d'une réduction des taux de renouvellement de la noradrénaline, de la dopamine et de la sérotonine (Frey et coll., 1991 ; Velluci et File, 1979). Une modification de la conformation du récepteur GABA_A sous l'action d'un traitement prolongé aux BZD pourrait expliquer cette diminution de la sensibilité du récepteur vis-à-vis du GABA (Miller et coll., 1988). Dans notre étude, la diminution de l'UCLG qui est observée chez les animaux traités au DZ à 21 jours d'âge postnatal dans les principaux groupements cellulaires de monoamines tels que les noyaux du raphé, le locus coeruleus, l'aire tegmentale ventrale ou la substance noire peut être corrélée à la dépression du métabolisme des catécholamines consécutive au développement de cette tolérance.

Il est également important de préciser que la tolérance aux BZD ne paraît pas être une conséquence de modifications de la pharmacocinétique de ces produits mais bien des perturbations de certains mécanismes neurobiologiques (Gonsalves et Gallagher, 1987 ; Greenblatt et Shader, 1986 ; Haigh et coll., 1986), ce que confirme l'absence de sédation qui a

pu être observée chez les animaux au cours de la dernière semaine de traitement alors que le pic plasmatique de DZ est atteint dans les quelques minutes qui suivent son injection.

Les aires cérébrales qui sont les plus sensibles à une exposition chronique précoce au DZ entre le 10^{ème} et le 21^{ème} jour de vie postnatale appartiennent aux différents systèmes sensoriels ou à l'hypothalamus comme les corps mammillaires. Ces derniers représentent une région du cerveau qui paraît être particulièrement vulnérable à une administration aiguë ou chronique de DZ chez l'animal adulte (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Laurie et Pratt, 1989 ; Nehlig et coll., 1987) ainsi qu'à d'autres ligands des récepteurs aux BZD comme les β -carbolines qui sont connues pour leurs propriétés anxiogènes et convulsivantes (Ableitner et Herz, 1987 ; Pratt et coll., 1988). Les corps mammillaires sont également une région cérébrale très riche en récepteurs aux BZD et ce, dès la naissance (Daval et coll., 1991 ; Young et Kuhar, 1980), ce qui pourrait expliquer la sensibilité particulière de cette structure au traitement. D'autre part, cette région du cerveau est connue pour jouer un rôle dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété avec l'amygdale et le thalamus (Kataoka et coll., 1982, 1987). La réduction de l'UCLG dans cette structure entre 10 et 21 jours alors que le taux d'utilisation de glucose mesuré dans l'amygdale n'est diminué qu'à 14 jours, confirme donc l'effet anxiolytique à court terme du DZ qui est observé dans différentes études comportementales (Cuomo, 1987 ; Gardner, 1985 ; File, 1986c).

L'administration de DZ déprime l'UCLG dans les noyaux du raphé alors qu'il a été démontré que les BZD modulent l'activité électrophysiologique de ces noyaux (Gallager et coll., 1985) et produisent un effet anxiolytique quand elles sont injectées directement dans ces structures (Thiebot et coll., 1982). De plus, il semble que l'effet anxiolytique des BZD soit lié à la réduction du taux de renouvellement de la sérotonine (Vellucci et File, 1979). Nos résultats confirment donc bien les effets modulateurs du DZ sur la neurotransmission sérotoninergique et son implication dans les mécanismes biologiques de l'anxiété. De plus, les voies sérotoninergiques pourraient médier une partie des effets anxiolytiques des BZD.

Le DZ provoque également une diminution importante de l'UCLG dans différentes structures sensorielles comme les aires corticales visuelle, auditive et olfactive, les corps genouillés et le noyau vestibulaire.

L'atteinte de plusieurs noyaux du système auditif confirme ainsi le retard de maturation des voies auditives chez des animaux immatures traités avec du DZ qui a été mis en évidence par Kellogg et coll. (1980, 1983). Ces auteurs rapportent que l'administration précoce de DZ interfère avec le développement d'une réaction de sursaut au bruit chez le rat immature (Kellogg et coll., 1980) et induit une baisse de l'acuité auditive temporelle qui persiste à plus long terme (Kellogg et coll., 1983).

Il semble donc que les aires sensorielles soient particulièrement vulnérables à une exposition précoce au DZ du fait, d'une part de la densité importante de récepteurs aux BZD dans ces structures dès la naissance (Daval et coll., 1991 ; Young et Kuhar, 1980), d'autre part

de la particularité de l'évolution des taux de métabolisme au cours du développement (Nehlig et coll., 1988). En effet, ces structures sont caractérisées par une activation métabolique intense et brutale au moment où les différentes fonctions sensorielles apparaissent, à savoir 10-12 jours après la naissance pour l'audition et 14-15 jours pour la vision (Nehlig et coll., 1988).

Les BZD sont aussi connues pour leurs propriétés myorelaxantes qui seraient dues à une diminution de l'activité fonctionnelle de la formation réticulée activatrice au niveau central. Nakamura et coll. (1993) ont récemment montré que le DZ provoque une réduction des taux d'UCLG mesurés dans les différents noyaux du cervelet et le noyau vestibulaire médian, chez des rats adultes décérébrés, suggérant que ces structures seraient à l'origine de l'action myorelaxante des BZD. Cette dépression est également observée dans ces régions à 14 et 21 jours de vie postnatale ainsi que dans la plupart des aires motrices. Ces baisses de l'activité fonctionnelle cérébrale induites par le DZ pourraient être à la base de la réduction de l'hyperactivité motrice qui apparaît au cours des convulsions et des modifications du comportement locomoteur qui ont été observé par ailleurs dans cette étude comme l'allongement du temps de suspension.

2.4. Développement neuromoteur

Les résultats de notre étude montrent que l'exposition chronique des animaux au DZ au cours des 3 premières semaines de vie postnatale a pour conséquence un retard relativement discret du développement neuromoteur des rats. Ce retard se traduit plus spécifiquement par des troubles de l'équilibre et un défaut de coordination locomotrice observés à 9 et 20 jours de vie postnatale ainsi que par un relâchement musculaire qui est mis en évidence dans notre étude à l'âge de 10 jours. Par contre, le réflexe de retournement testé au 4^{ème} jour de vie postnatale n'est pas modifié par le DZ.

Ces observations sont en accord avec celles d'autres études qui ont montré des effets comparables de l'administration de BZD en période pré ou postnatale sur le développement neuromoteur des animaux.

De la même façon que dans notre étude, le réflexe de retournement n'est pas affecté par l'administration pré ou postnatale de DZ (Frieder et coll., 1984a ; Gai et Grimm, 1982 ; Ryan et Pappas, 1986) ou de CDP (Adams, 1982 ; Pankaj et Brain, 1991).

L'administration chronique de DZ induit un allongement du temps de réaction anti-gravitaire qui traduit chez l'animal des perturbations de l'équilibre et de son positionnement dans l'espace. Le DZ ou le CDP, administrés au cours de la période périnatale, provoque un allongement du temps de rotation sur une surface plane (Ryan et Pappas, 1986) ainsi qu'un délai dans l'apparition du réflexe de retrait face au vide (Adams, 1982), ce qui indique comme la présente étude, que les BZD perturbent la maturation du système vestibulaire responsable

du contrôle de l'équilibre et du maintien postural (Guyton, 1989). D'autre part, nos résultats sont révélateurs de modifications de la coordination des pattes avant induite par le DZ. La marche quadrupédique ne commence à apparaître chez le rat que vers le 10^{ème} jour de vie postnatale (Altman et Sudarshan, 1975 ; Westerga et Gramsbergen, 1990). Avant ce stade, l'animal se déplace par reptation ou par rotation autour d'un axe formé par la partie arrière de son corps en soulevant la partie avant et en prenant appui alternativement sur les 2 pattes avant (Altman et Sudarshan, 1975). La coordination des pattes avant est donc un élément essentiel dans cette forme de locomotion. Elle est encore plus importante dans le test de réaction anti-gravitaire, particulièrement lors du passage à l'horizontale. Un allongement du temps pris pour effectuer ce test peut donc être le reflet d'un défaut de coordination motrice et d'une immaturité dans les voies de contrôle de la motricité.

Les résultats du test de réaction anti-gravitaire vont dans le même sens que ceux obtenus dans le test de coordination locomotrice effectué 11 jours plus tard. Dans ce test, le DZ n'induit une différence significative par rapport aux témoins que dans la dernière phase de l'épreuve, à savoir le passage de la tige à la plate-forme. Cette phase nécessite une bonne coordination des pattes postérieures, particulièrement au moment où l'animal lâche la tige et pose ses pattes arrières sur la plate-forme pour se rétablir (Altman et Sudarshan, 1975). Les deux autres phases du test, c'est-à-dire la phase de nage et celle de grimpée le long de la tige ne sont pas affectées par le traitement. De même, la nage, testée dans un labyrinthe aquatique à différents stades du développement postnatal, n'est pas perturbée par une exposition postnatale au clonazépam (Wang et Huang, 1990) ou l'administration de DZ pendant la dernière semaine de gestation (Ryan et Pappas, 1986). En ce qui concerne la 2^{ème} partie du test, la grimpée, nos résultats vont dans le même sens que ceux de Gai et Grimm (1982) qui n'ont mis en évidence aucun effet d'une exposition prénatale au DZ sur l'équilibre et la locomotion des animaux testés avec une plate-forme horizontale dont on augmente progressivement la pente.

Cependant, d'après l'observation des animaux au cours du test, il est possible de dire que le DZ induit des troubles de la coordination motrice, mais qui restent relativement discrets, le test n'étant pas suffisamment "sensible" pour les faire apparaître. Ainsi, les animaux traités au DZ nagent en rond dans la piscine sans jamais chercher à aller directement d'un bord à l'autre en ligne droite. Ce comportement correspond à celui observé par Adams (1982) chez des rats traités chroniquement avec du CDP (1 mg/kg/jour) en période pré ou postnatale. D'autre part, les animaux traités au DZ grimpent le long de la tige en faisant une spirale autour de celle-ci alors que les témoins grimpent de manière rectiligne. De plus, les animaux traités au DZ ont tendance à lâcher plus souvent la tige mais arrivent à la récupérer alors que les témoins ne la lâchent jamais. Ces deux comportements anormaux peuvent refléter des problèmes neuromoteurs inhérents à l'exposition au DZ. Cependant, ils ne se manifestent pas de manière suffisamment importante pour induire des modifications significatives du temps de grimpée

tout en confirmant les effets relativement discrets et subtils d'une exposition précoce au DZ sur le développement neuromoteur des animaux.

Comme dans le cas d'une exposition prénatale (Myslivecek et coll., 1991), l'administration postnatale de DZ induit un allongement du temps de suspension mesuré au 10ème jour de vie postnatale. Cette augmentation n'est pas corrélée au déficit de poids corporel observé chez les mêmes animaux. Ces données sont donc révélatrices d'une part, du comportement peu actif de l'animal à cet âge et d'autre part, du possible effet myorelaxant des BZD (Myslivecek et coll., 1991). En effet, le DZ exerce un effet myorelaxant sur la rigidité obtenue par décérébration chez le rat adulte qui paraît lié à une dépression de l'activité fonctionnelle dans la formation réticulée, le cervelet et les noyaux vestibulaires (Nakamura et coll., 1993), ce qui est également observé dans notre étude au cours du développement postnatal (Schroeder et coll., 1994b).

Ces troubles du développement neuromoteur sont bien corrélés aux baisses significatives de l'UCLG mises en évidence dans au cours du développement postnatal dans différentes structures impliquées dans le contrôle de l'équilibre, de la visuomotricité et le maintien postural comme le noyau vestibulaire, les noyaux du cervelet, différentes aires pontiques, les noyaux gris centraux et les régions appartenant au système visuel (Schroeder et coll., 1994b). Certaines de ces structures, qui sont localisées au niveau postérieur, sont matures très tôt (Nehlig et coll., 1988) et paraissent de ce fait très sensibles à l'exposition au DZ.

En effet, c'est pendant les 14 premiers jours de vie postnatale qui correspondent à la période de croissance neuronale, de synaptogénèse et de maturation des différents systèmes de neurotransmission, que les régions postérieures du cerveau semblent être les plus vulnérables au DZ. C'est également au cours de cette période que les taux plasmatiques et cérébraux de DZ les plus élevés ont été observés (Schroeder et coll., 1994a).

Au cours du développement postnatal, les noyaux du cervelet et le noyau vestibulaire qui sont largement impliqués dans le contrôle de l'équilibre et de la posture, établissent de nombreuses connections entre eux et avec d'autres structures comme les formations réticulées inhibitrice et activatrice, les noyaux gris centraux et certaines aires visuelles (Gauthier et coll., 1994 ; Guyton, 1989).

Le fait que le DZ induise une dépression de l'UCLG dans les structures "centrales" de ce système ainsi que des troubles comportementaux de l'équilibre et de la coordination suggère que le DZ, administré au cours de la période de synaptogénèse, pourrait perturber l'établissement de ces connections et le fonctionnement des différents systèmes de neurotransmission comme les systèmes GABAergique et dopaminergique qui sont à la base du développement de la locomotion chez le rat (Clarac, communication personnelle).

Ainsi, une exposition périnatale aux BZD provoque une diminution du taux de renouvellement de la dopamine mais uniquement dans des structures mésolimbiques comme le noyau accumbens ou l'aire tegmentale ventrale (Deutch et coll., 1989 ; Gruen et coll., 1990) qui est associée à des déficits de l'activité locomotrice et du comportement d'exploration (Gruen et coll., 1989). Par ailleurs, le noyau accumbens est une structure dopaminergique dont le rôle dans la locomotion et l'exploration est primordial et maintenant bien établi (Fink et Smith, 1980a, 1980b ; Herman et coll., 1988 ; Kelley et Stinus, 1984).

Les effets d'une exposition précoce aux BZD sur la transmission dopaminergique paraît être la conséquence de l'interaction des BZD avec les récepteurs GABA/BZD. Ainsi, contrairement au DZ, l'administration aiguë d'une β -carboline comme le FG 7142 induit une diminution de la synthèse et du taux de renouvellement de la dopamine dans le striatum et la substance noire alors que le métabolisme dopaminergique est augmenté dans l'aire tegmentale ventrale (Knorr et coll., 1987 ; Tam et Roth, 1985 ; Tam et coll., 1985), ce qui indique le rôle des récepteurs aux BZD dans la régulation des fonctions catécholaminergiques (Pittaluga et Raitini, 1988). Des modifications de l'affinité et/ou de la densité de ces récepteurs à la suite d'un traitement précoce au DZ (Avnimelech-Gigus et coll., 1986 ; Kellogg et coll., 1983 ; Livezey et coll., 1986a, 1986b ; Rothe et Bigl, 1989 ; Shibuya et coll., 1986) pourrait donc avoir des conséquences sur la régulation de la neurotransmission dopaminergique et les comportements locomoteurs qu'elle contrôle.

D'autre part, la présence de récepteurs aux BZD en relativement faible quantité dans les structures cérébrales appartenant au système dopaminergique tant au cours du développement postnatal qu'à l'âge adulte (Daval et coll., 1991 ; Dennis et coll., 1988 ; Young et Kuhar, 1980) laisse à penser que les modifications de l'affinité et/ou de la densité de ces récepteurs par le DZ n'a pas un effet direct sur la transmission dopaminergique. Par contre, il a été suggéré que le DZ puisse altérer l'affinité ou la densité de récepteurs présents au niveau des interneurons GABAergiques qui régulent au niveau présynaptique la libération et le renouvellement de la dopamine à partir des neurones des voies mésocorticales et nigrostriées (Cheramy et coll., 1978 ; Chesselet, 1985 ; Meinecke et coll., 1989 ; Mugnaini et Oertel, 1985 ; Palfreyman et coll., 1978 ; Scheel-Kruger et coll., 1977).

Les premiers récepteurs aux BZD apparaissent à la fin de la 2^{ème} semaine de gestation chez le rat (Bastrup et Nielsen, 1978). A la naissance, le nombre de récepteurs aux BZD mis en évidence ne représente que 25 % de celui mesuré chez l'adulte (Daval et coll., 1991). L'administration chronique de DZ du 2^{ème} au 21^{ème} jour de vie postnatale a donc lieu pendant une période importante de l'ontogenèse de ces récepteurs (Daval et coll., 1991 ; Mallorga et coll., 1980). De plus, le développement de la transmission dopaminergique a lieu également chez le rat de la 2^{ème} semaine de gestation au 20^{ème} ou 60^{ème} jour de vie postnatale selon les régions cérébrales (Olson et coll., 1972 ; Berger et Verney, 1984). Il est donc concevable que, dans notre étude, l'administration chronique de DZ au cours des

premières semaines de vie postnatale puisse induire des modifications dans l'organisation des systèmes de neurotransmission GABAergique et catécholaminergiques avec pour conséquence une dépression de l'activité fonctionnelle cérébrale enregistrée dans les structures de ces différents systèmes et des perturbations relativement subtiles du développement neuromoteur des animaux.

3. EFFETS A LONG TERME DU DIAZEPAM SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL ET LE COMPORTEMENT.

Dans notre étude, une diminution de l'UCLG a été observée 39 jours après l'arrêt du traitement dans 14 des 66 structures cérébrales étudiées, indiquant que les effets à long terme du DZ restent modérés par rapport à ceux mesurés au court du développement postnatal.

De la même manière, des études menées chez l'animal adulte montrent une réduction du nombre de structures dont le métabolisme est déprimé après un traitement chronique au DZ (Ableitner et coll., 1985 ; Laurie et Pratt, 1989).

Comme dans le cas d'une administration chronique ou aiguë chez l'adulte, une exposition chronique précoce au DZ induit à long terme des perturbations du métabolisme énergétique dans des régions du cerveau qui sont impliquées dans les fonctions cérébrales généralement affectées par les BZD (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Laurie et Pratt, 1989 ; Nehlig et coll., 1987). Ainsi, le DZ déprime l'UCLG dans plusieurs structures du système limbique, siège de l'anxiété, comme les aires corticales frontale, préfrontale et cingulaire, le septum, le thalamus, l'hippocampe et les corps mammillaires, dans des régions impliquées dans la mémoire telles que l'hippocampe, le thalamus et certains cortex, et dans différentes structures du système moteur comme le noyau caudé ou le globus pallidus. Or, les BZD ont une action anxiolytique, myorelaxante et anticonvulsivante et sont connues pour induire des amnésies.

De plus, les résultats des tests de comportement que nous avons effectués confirment ceux obtenus dans l'étude au 2DG-(¹⁴C), faisant apparaître un possible effet anxiolytique et amnésiant à long terme du DZ.

3.1. Effet anxiolytique

Les résultats des tests de comportement utilisés dans cette étude font apparaître un effet anxiolytique et désinhibiteur à long terme du DZ, reflété par des modifications du comportement d'exploration des animaux dans la boîte à 2 compartiments et le labyrinthe à 8 branches. Cependant, cet effet anxiolytique n'a pas été retrouvé dans le labyrinthe en croix surélevée ou le test social de la "piscine".

De même, Livezey et coll. (1986b) montrent qu'un traitement prénatal au DZ induit à long terme un état chronique d'hyperexcitabilité ainsi qu'une hyperactivité des animaux dans le labyrinthe à 8 branches. L'administration du DZ au début de la vie postnatale a également pour conséquence une augmentation des interactions sociales, un accroissement du comportement agressif des animaux traités envers des intrus venant d'une communauté étrangère et une diminution de la peur ressentie par l'animal traité lorsqu'il est introduit dans une communauté étrangère de rats (File, 1986a, 1986c ; File et Tucker, 1983).

L'ensemble de ces résultats suggère un possible effet anxiolytique à long terme des BZD lorsqu'elles sont administrées en période néonatale.

Le système limbique est considéré comme le siège des émotions et, à ce titre, est impliqué dans les mécanismes neurobiologiques de l'anxiété avec d'autres régions du cerveau comme l'hypothalamus. Le circuit du système limbique est relativement complexe et comporte de nombreuses structures comme l'hippocampe, le thalamus, l'amygdale ou le septum, et des noyaux plus postérieurs comme la matière grise périaqueducule ou certains groupements cellulaires de monoamines (noyaux du raphé, locus coeruleus, aire tegmentale ventrale). Il convient également de citer l'hypothalamus qui, du point de vue anatomique, est considéré comme une structure distincte du système limbique, mais qui, du point de vue physiologique, apparaît comme l'un des éléments centraux de ce système (Guyton, 1989).

Les BZD exerceraient leur effet anxiolytique en déprimant l'activité fonctionnelle cérébrale du système limbique. Ainsi, des études électrophysiologiques ont montré une dépression de l'hippocampe, de l'amygdale et d'autres structures associées après un traitement par les BZD (Robinson et Wang, 1979). De même, notre étude nous a permis d'observer à long terme une diminution significative de l'UCLG chez les animaux traités au DZ dans un certain nombre de structures limbiques telles que le cortex cingulaire, l'hippocampe, le septum ou les corps mammillaires.

Les corps mammillaires ainsi que le reste de l'hypothalamus semblent faire partie des structures les plus sensibles sur le plan métabolique à l'action du DZ, que ce soit lors de traitements aigus, subchroniques ou chroniques (Ableitner et coll., 1985 ; Kelly et coll., 1986 ; Laurie et Pratt, 1989 ; Nehlig et coll., 1987). L'injection de β -carbolines comme le FG 7142 ou le DMCM qui sont des agonistes inverses des récepteurs aux BZD et qui sont connus pour leurs effets anxiogènes et convulsivants, induit une augmentation de l'UCLG dans les corps mammillaires (Ableitner et Herz, 1987 ; Pratt et coll., 1988) alors que l'administration d'un antagoniste des récepteurs aux BZD, le Ro 17-1588, bloque l'action des β -carbolines dans cette structure (Ableitner et Herz, 1987).

Les corps mammillaires font partie du "circuit de Papez" qui constitue la base anatomique de l'émotivité (Papez, 1937). Ils contiennent des neurones noradrénergiques (Jacobowitz et Palkovitz, 1974 ; Lindvall et Björklund, 1974 ; Moore et Bloom, 1978),

reçoivent des afférences du noyau ventromédian de l'hypothalamus (Saper et coll., 1976) et envoient des projections vers le cortex frontal via le thalamus antérieur ainsi que vers le tegmentum dorsal et ventral (Cruce, 1975). L'injection de DZ directement dans les corps mammillaires provoque une réduction du comportement d'anxiété dans des tests de conditionnement (Kataoka et coll., 1982) et des lésions de cette structure ont pour conséquence la diminution de l'état d'anxiété que ce soit dans des tests de conditionnement (Shibata et coll., 1986) ou le labyrinthe en croix surélevée (Beracochea et Krazem, 1991).

Par ailleurs, l'administration chronique de DZ au cours de la gestation induit à long terme et uniquement dans l'hypothalamus une diminution de la concentration et du taux de renouvellement de la noradrénaline (Simmons et coll., 1984a) ainsi que de la libération de noradrénaline-(³H) induite par dépolarisation membranaire en présence de potassium (Kellogg et Retell, 1986). De plus, l'administration précoce de DZ induit une diminution du renouvellement de la noradrénaline ainsi que des taux plasmatiques de cortisol chez des animaux soumis à un stress physique ou chimique (Simmons et coll., 1984b). Dans tous les cas, les effets du traitement précoce au DZ sont antagonisés par l'administration de Ro 17-1588, ce qui démontre une étroite relation entre le fonctionnement de la neurotransmission noradrénergique et les récepteurs aux BZD qui ne paraît exister que dans l'hypothalamus.

Ces résultats ainsi que ceux obtenus au cours de notre étude montrent donc qu'une exposition chronique précoce au DZ induit une dépression à long terme de l'activité fonctionnelle cérébrale et de la régulation noradrénergique dans l'hypothalamus qui serait à la base d'un effet anxiolytique et désinhibiteur des BZD à long terme.

De plus, les densités élevées de récepteurs aux BZD observées dès la naissance dans les corps mammillaires, l'hypothalamus dorso et ventromédian (Daval et coll., 1991) laissent à penser que l'administration précoce de DZ au cours de la phase de synaptogénèse est à même de perturber le développement de différents systèmes de neurotransmission comme celui de la noradrénaline dans l'hypothalamus et ce, de manière irréversible, puisque des perturbations métaboliques et comportementales directement reliées à ces structures sont observées 40 jours après l'arrêt du traitement.

La présence de récepteurs aux BZD ainsi que de neurones GABAergiques dans les corps mammillaires (Tappaz et coll., 1977) suggère également que le DZ pourrait perturber, dans cette partie du cerveau comme à d'autres niveaux, le développement de la transmission GABAergique avec pour conséquence des modifications de l'équilibre entre les systèmes inhibiteurs et excitateurs du cerveau et de l'état de vigilance.

A l'inverse de l'hypothalamus, l'administration chronique précoce de DZ n'induit pas de modifications significatives de l'UCLG dans l'amygdale. De même, Kelly et coll. (1986) observent que l'amygdale est une des structures où la baisse de l'UCLG induite par l'injection

aiguë de DZ est la plus faible et que cette région du cerveau semble paradoxalement peu sensible à l'action des BZD.

Pourtant, l'amygdale est une structure clé du contrôle de l'anxiété (Davis, 1992). Des lésions de l'amygdale provoquent une augmentation de la résistance au stress des animaux dans différents tests d'anxiété (Yadin et coll., 1991) et atténue la formation d'ulcères gastriques induite par le stress (Henke, 1980). Par ailleurs, chez le rat, l'injection de DZ directement dans l'amygdale, une des structures cérébrales les plus riches en récepteurs aux BZD (Daval et coll., 1991 ; Dennis et coll., 1988 ; Young et Kuhar, 1980), diminue l'intensité de la réaction de sursaut provoqué par le bruit, ce qui traduit une baisse du niveau d'anxiété des animaux (Young et coll., 1991). L'administration intraamygdalienne de midazolam induit également une diminution de l'état d'anxiété des rats, reflétée par un accroissement du nombre d'entrées dans les branches ouvertes du labyrinthe en croix surélevée (Green et Vale, 1992).

Mais, un travail récent vient de montrer que le CDP continue à avoir un effet anxiolytique chez des rats où les amygdales ont été détruites (Yadin et coll., 1991). Ces résultats ont amené Yadin et coll. (1991) à suggérer qu'il existerait d'autres mécanismes de régulation de l'anxiété au niveau cérébral qui seraient activés du fait de la destruction de l'amygdale. En fait, il est possible que le rôle de l'amygdale dans les effets anxiolytiques des BZD soit modulé en fonction de l'intensité de l'inhibition que cette région exercerait sur d'autres structures dans le cerveau. La lésion de l'amygdale aurait alors pour conséquence de lever cette inhibition et de potentialiser l'action des anxiolytiques. Un certain nombre d'études indiquent que le septum pourrait être une des structures soumises à l'influence inhibitrice de l'amygdale. Ainsi, les lésions de l'amygdale ont un effet anxiolytique comparable à celui des BZD (Shibata et coll., 1986 ; Yadin et coll., 1991) alors que celles du septum auraient, au contraire, une action anxiogène (Yadin et Thomas, 1991).

Le niveau d'anxiété d'un individu serait donc fonction de l'équilibre qui existerait entre les effets anxiogènes de l'amygdale et anxiolytiques du septum (Yadin et coll., 1991). Cette hypothèse vient d'être récemment confirmée par Pesold et Treit (1994) qui, en injectant du midazolam directement dans le septum ou l'amygdale, ont montré que ces 2 structures ont effectivement des rôles inverses dans le contrôle de l'anxiété testée dans différentes situations comme le labyrinthe en croix surélevée ou le test d'évitement d'un choc électrique.

Les résultats de notre étude montrent que les taux d'UCLG mesurés chez l'adulte ne sont pas modifiés chez les animaux traités au DZ dans l'amygdale alors qu'ils sont significativement diminués dans le septum. Le même phénomène est constaté chez le rat adulte après un traitement chronique au DZ de 28 jours à la dose de 5 mg/kg/jour (Laurie et Pratt, 1989). Par ailleurs, l'administration aiguë de β -carboline comme le FG 7142 ou la DMCM n'induit une augmentation de l'UCLG que dans le septum (Ableitner et Herz, 1987 ; Pratt et coll., 1988), ce qui, avec les résultats précédents, suggère que le septum paraît plus sensible que l'amygdale à l'action des différents ligands des récepteurs aux BZD.

Par rapport à l'hypothèse formulée par Yadin et coll. (1991) et confirmée par Pesold et Treit (1994), nos résultats semblent indiquer que l'amygdale aurait toujours une action inhibitrice sur le septum malgré un traitement précoce au DZ et que le niveau d'anxiété des animaux traités au DZ resterait comparable à celui des témoins. Ceci pourrait alors expliquer l'absence d'effets à long terme du DZ dans le labyrinthe en croix surélevée et le test social de la "piscine" qui sont des tests particulièrement aversifs. Par contre, le DZ paraît capable d'exercer un effet anxiolytique à long terme lorsque l'on utilise des tests moins aversifs comme la boîte à 2 compartiments.

3.2. Effet sur la mémoire

Un des effets indésirables des BZD est une amnésie antérograde qui peut apparaître au cours du traitement. Cette amnésie porte sur l'acquisition des nouveaux souvenirs et non sur le rappel des souvenirs plus anciens (Brunel et coll., 1990 ; Curran, 1991 ; Lister, 1985). L'origine exacte de ce phénomène n'est pas clairement établie à l'heure actuelle, à savoir si les BZD ont un effet direct sur la mémoire ou si cet effet est lié aux propriétés sédatives, anxiolytiques de cette classe thérapeutique.

Le DZ induit des déficits de la mémoire spatiale testée dans le labyrinthe aquatique de Morris (Arolfo et Brioni, 1991 ; McNamara et Skelton, 1991). Ces déficits affectent plus particulièrement la mémoire à court terme, c'est-à-dire l'acquisition des repères spatiaux nécessaires aux animaux pour s'orienter dans le labyrinthe et ne paraissent pas liés aux propriétés sédatives du DZ (McNamara et Skelton, 1991). Ces données sont confirmées par différentes études qui ont mis en évidence une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémorisation après injection de β -carboline. Par contre, après administration de Ro 17-1588, un antagoniste spécifique des récepteurs aux BZD, l'injection de β -carboline n'a plus aucun effet sur les capacités de mémorisation des animaux (Chapoutier et coll., 1991 ; Lal et coll., 1988). Par ailleurs, l'administration de flumazénil bloque les effets amnésiants du muscimol, un agoniste des récepteurs $GABA_A$ (Izquierdo et coll., 1990) et améliore les capacités de mémorisation des animaux dans différents types de tests, mais uniquement lorsqu'il est injecté avant l'apprentissage du test (Izquierdo et Medina, 1991).

Ces résultats sont révélateurs du rôle du complexe récepteur $GABA_A/BZD$ et des ligands endogènes des récepteurs des BZD dans la régulation des processus de mémorisation. Il est maintenant admis que les agonistes endogènes de ces récepteurs modulent négativement les processus de mémorisation et plus particulièrement l'acquisition de nouvelles informations (Izquierdo et Medina, 1991).

Dans notre étude, l'administration chronique de DZ en période postnatale semble avoir un effet amnésiant dans le labyrinthe en T mais qui n'est pas confirmé dans le labyrinthe à 8 branches. Dudchenko et Sarter (1992) montrent que le CDP, administré chez des rats adultes, n'a pas d'effets sur le pourcentage d'alternance spontanée dans un labyrinthe en T quelle que soit la durée du délai entre les 2 essais. Les résultats des études qui ont utilisé le labyrinthe à 8 branches sont également variables. Ainsi, l'administration de CDP peut induire un déficit des capacités d'apprentissage dans ce type de labyrinthe (Hodges et Green, 1986 ; Willner et Birbeck, 1984) ou bien ne rien modifier (Hiraga et Iwasaki, 1984). De même, Livezey et coll. (1986b) notent un déficit de la mémoire spatiale dans un labyrinthe à 8 branches chez des animaux traités avec du DZ pendant la dernière semaine de gestation alors que Benton et coll. (1985) rapportent une augmentation des performances de souris soumises au même traitement dans ce labyrinthe.

Les résultats que nous avons obtenus dans ces 2 labyrinthes posent le problème de l'effet réel des BZD administrées en période périnatale sur la mémoire et de la modulation de ce possible effet amnésiant en fonction de la motivation exercée par le test. En effet, le labyrinthe en T est un test sans récompense basé uniquement sur l'attrait exercé par un environnement nouveau alors que le labyrinthe à 8 branches repose sur une motivation d'ordre alimentaire. Les animaux qui sont laissés à jeun pendant toute la durée de l'expérimentation dans le cas du labyrinthe à 8 branches, ne l'explorent que pour récupérer le maximum de nourriture avec un minimum d'effort. Cette discordance entre les 2 labyrinthes a été également observée dans un modèle d'exposition chronique précoce au PhB (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990b) en dépit de déficits fonctionnels beaucoup plus importants avec cette drogue qu'avec le DZ (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a ; Schroeder et coll., 1994b). Ces résultats sont donc révélateurs du fort pouvoir d'adaptation des animaux malgré les effets toxiques centraux du PhB ou du DZ dès lors que l'on touche à la notion de survie de l'individu.

Les structures cérébrales impliquées dans les processus de mémorisation sont l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus dorsomédian, les corps mammillaires, les cortex préfrontal et cingulaire (Duyckaerts et coll., 1991 ; Miskin et Appenzeller, 1987 ; Thompson, 1992). Ainsi, des lésions de l'hippocampe et de l'amygdale ont pour conséquences le blocage de l'action des agonistes GABAergiques type muscimol ou des antagonistes du GABA comme la bicuculline sur la mémoire (Ammassari-Teule et coll., 1991) et de faire disparaître les effets amnésiants du DZ (Tomaz et coll., 1991). De même, l'injection intraamygdalienne ou intraseptale des mêmes agonistes ou antagonistes du GABA module les capacités d'apprentissage des animaux dans différents types d'épreuves (Brioni et coll., 1989, 1990). Ces résultats confirment donc le rôle de ces différentes structures dans les processus d'acquisition et de consolidation de la mémoire.

Certaines de ces structures comme l'hippocampe, l'amygdale ou le septum présentent très tôt au cours du développement postnatal, une densité élevée de récepteurs aux BZD (Aldinio et coll., 1981 ; Bastrup et Nielsen, 1978 ; Daval et coll., 1991 ; Young et Kuhar, 1980). L'administration chronique de DZ pendant la même période peut perturber la synaptogénèse et le développement de la transmission GABAergique, plus particulièrement dans ces régions, et modifier ainsi à plus ou moins long terme le rôle modulateur de ce système de neurotransmission dans les processus de mémorisation. D'autre part, la transmission GABAergique module dans le septum et l'amygdale, l'activité d'autres systèmes de neurotransmission comme le système cholinergique qui est très impliqué dans la mémoire (Brioni et coll., 1990 ; Hagan et coll., 1987, 1988). Or, Frieder et Grimm (1985) ont montré une baisse significative du prélèvement d'acétylcholine dans l'hippocampe et le cortex chez des animaux de 60 jours exposés à un traitement chronique au DZ pendant la période postnatale alors qu'une diminution de l'UCLG a été observée dans le septum et l'hippocampe au cours de notre étude, ce qui confirme les effets délétères des BZD sur le développement de la neurotransmission GABAergique et par rebond, sur d'autres systèmes de neurotransmission comme celui de l'acétylcholine avec pour conséquence des troubles des capacités d'apprentissage et de mémorisation.

3.3. Effet myorelaxant

Le DZ, comme la plupart des BZD, est connu pour son action myorelaxante et son action sur la coordination motrice. Les résultats de notre étude laissent apparaître des baisses de 10 à 18 % dans les structures supérieures du système extrapyramidal moteur comme le cortex moteur, le noyau caudé ou le globus pallidus. Par contre, aucun effet à long terme n'a été observé sur des territoires cérébraux plus postérieurs et impliqués dans la coordination motrice et la tonicité musculaire comme le noyau rouge, les noyaux gris pontiques ou les noyaux du cervelet.

L'administration aiguë de DZ réduit significativement le taux d'UCLG dans le globus pallidus, le thalamus ventrolatéral et le noyau rouge (Kelly et coll., 1986) alors que le FG 7142, une β -carboline, augmente l'utilisation de glucose dans le thalamus ventral (Ableitner et Herz, 1987). Le DZ induit également une augmentation de l'UCLG observée après décérébration chez le rat adulte dans les noyaux du cervelet et le noyau vestibulaire (Nakamura et coll., 1991).

Il semble donc que seule l'administration aiguë de BZD puisse induire des baisses métaboliques dans des structures cérébrales impliquées dans la motricité et avoir ainsi une activité myorelaxante. Cette hypothèse est confirmée dans notre étude par la dépression de l'UCLG observée dans ces régions au court de la période de traitement et l'allongement du temps de suspension observé à 10 jours de vie postnatale.

3.4. Effet sur les aires sensorielles

Dans notre étude, le DZ induit à long terme une diminution des taux d'UCLG dans la plupart des aires sensorielles étudiées telles que les cortex visuel et auditif, les colliculi inférieur et supérieur ou les corps genouillés. L'administration aiguë ou chronique de DZ chez le rat adulte déprime également le niveau d'utilisation de glucose dans les mêmes structures (Ableitner et coll., 1985 ; Laurie et Pratt, 1989 ; Kelly et coll., 1986 ; Nehlig et coll., 1987).

La plupart des aires visuelles et auditives ont une densité de récepteurs aux BZD élevée dès le 1er jour de vie postnatale (Aldinio et coll., 1981 ; Daval et coll., 1991) ; Young et Kuhar, 1980). Elles représentent donc des sites privilégiés de fixation du DZ dès le début de la maturation postnatale. De plus, ces territoires cérébraux sont caractérisés par une augmentation rapide et brutale de leurs niveaux d'activité fonctionnelle au moment où les fonctions sensorielles deviennent actives (Nehlig et coll., 1988). Ces structures paraissent donc particulièrement vulnérables à toute forme d'agression pathologique ou médicamenteuse survenant au moment de la maturation des fonctions sensorielles.

Des études comportementales ont montré que l'administration chronique de DZ en période prénatale induit un retard de l'ordre de 8 jours dans l'apparition du réflexe de sursaut au bruit chez le rat (Kellogg et coll., 1980) ainsi qu'une baisse de l'acuité auditive temporelle à partir de 28 jours postnatals et persistant jusqu'à l'âge de 70 jours (Kellogg et coll., 1983). De plus, aucune potentialisation de cette réaction en fonction de l'intensité du bruit n'a pu être mise en évidence chez les animaux traités au DZ (Kellogg et coll., 1980).

Kellogg et coll. (1991) ont montré que ce réflexe de sursaut au bruit est modulé via le complexe récepteur GABA_A/BZD et que seuls les récepteurs centraux des BZD semblent impliquer dans le développement de ce réflexe. Cependant, Kellogg et coll. (1980) attribuent les effets précoces du DZ sur la maturation de ce réflexe à une dépression de l'éveil et de la vigilance des animaux qu'à des modifications fonctionnelles spécifiques des aires auditives.

4. CORRELATION ENTRE LES EFFETS REGIONAUX DU DIAZEPAM SUR L'UTILISATION DE GLUCOSE ET LA LOCALISATION DES RECEPTEURS AUX BENZODIAZEPINES.

4.1. Ontogénèse des récepteurs aux benzodiazépines et corrélation avec les effets régionaux du diazépam sur le métabolisme énergétique cérébral.

Chez l'animal adulte, les plus fortes densités de récepteurs aux BZD sont observées dans les zones frontales et occipitales du néocortex, la substantia innominata et le gyrus denté de l'hippocampe. Des concentrations élevées sont également trouvées dans le reste du cortex, le striatum et l'ensemble du système limbique alors que les taux les plus faibles sont mesurés

dans la substance noire et le noyau subthalamique (Aldinio et coll., 1981 ; Daval et coll., 1991 ; Dennis et coll., 1988 ; Young et Kuhar, 1980).

Dans notre étude, une corrélation semble exister entre le nombre élevé de sites de liaison des BZD mesuré au 15^{ème} jour après la naissance dans différentes régions corticales, les aires visuelles, le septum, l'hippocampe, l'amygdale ou des noyaux plus postérieurs comme les noyaux du raphé ou les corps mammillaires (Daval et coll., 1991), et la dépression du métabolisme énergétique cérébral enregistrée dans les mêmes territoires chez les animaux traités au DZ au 14^{ème} jour de vie postnatale. Cependant, des baisses significatives de l'UCLG sont également observées au même stade dans la substance noire, le noyau caudé, l'hypothalamus et le thalamus alors que le nombre de récepteurs présent dans ces structures reste relativement faible (Daval et coll., 1991).

A 21 jours, cette corrélation ne paraît plus exister, le nombre de structures affecté par le DZ étant diminué de plus de la moitié entre 14 et 21 jours d'âge postnatal alors que la densité des récepteurs aux BZD est augmentée dans certaines des structures étudiées au cours de la même période (Daval et coll., 1991). Dans quelques régions du cerveau comme les aires visuelles et auditives, les taux de métabolisme mesurés chez les animaux traités au DZ restent significativement diminués par rapport aux témoins à 21 jours de vie postnatale alors que la densité des récepteurs mesurées dans ces structures ne varie pas entre 15 et 25 jours après la naissance (Daval et coll., 1991). Il est également à noter que l'UCLG mesurée dans le corps genouillé médian est diminuée de 30 % à 14 jours comme à 21 jours d'âge postnatal alors que la densité des récepteurs aux BZD diminue de 18 % dans cette région au cours de la même période (Daval et coll., 1991), ce qui met bien en évidence l'absence de corrélation entre le nombre de récepteurs GABA/BZD et le taux d'utilisation de glucose enregistrés dans différentes structures cérébrales à ce stade.

A l'âge adulte, soit 39 jours après l'arrêt du traitement, l'UCLG n'est plus déprimée que dans 14 structures cérébrales qui présentent des densités variables en récepteurs aux BZD. Il s'agit du cortex, de l'hippocampe et des corps mammillaires où les récepteurs aux BZD sont très nombreux mais également du septum et du noyau caudé où de plus faibles concentrations de récepteurs ont été observées (Daval et coll., 1991 ; Dennis et coll., 1988 ; Young et Kuhar, 1980). Par contre, aucune variation significative des taux d'utilisation de glucose n'a été enregistrée dans l'amygdale chez les rats adultes alors qu'elle fait partie des structures les plus riches en récepteurs aux BZD.

Des corrélations partielles entre la localisation des récepteurs aux BZD et les effets dépresseurs métaboliques de ces molécules ont été également mises en évidence dans l'étude des effets d'une injection aiguë de DZ chez l'animal adulte (Ableitner et coll., 1985 ; Nehlig et

coll., 1987). Par contre, aucune relation n'a été trouvée par Marietta et coll. (1990) dans l'étude des effets du sevrage sur l'UCLG chez des rats traités chroniquement au DZ.

En fait, il est difficile d'établir de telles corrélations. Du fait de la complexité du tissu nerveux et des nombreuses connections entre les structures cérébrales, une diminution de l'UCLG enregistrée dans une région ne signifie pas nécessairement une dépression de l'activité fonctionnelle dans cette région. Elle peut être le reflet d'une dépression métabolique survenant dans une autre région appartenant à la même voie nerveuse. Il en est de même pour la localisation des récepteurs aux BZD. La présence et la densité de récepteurs dans une structure n'ont pas obligatoirement une signification fonctionnelle directe. Elles ne permettent que de localiser le site primaire d'action des BZD dans le cerveau (Young et Kuhar, 1980).

Par contre, une relation plus intéressante paraît exister dans notre étude entre l'apparition des récepteurs aux BZD dans certaines structures et la dépression à long terme de l'UCLG induite par le DZ dans les mêmes régions. Ainsi, les récepteurs aux BZD sont présents dès la naissance à des concentrations de 60 à 120 femtomoles de flunitrazépam-(³H)/mg de tissu dans certaines aires corticales sensorielles et limbiques, le septum, l'hippocampe et les corps mammillaires (Daval et coll., 1991). Le DZ peut donc se fixer préférentiellement dans ces régions du cerveau dès le début du traitement et c'est dans ces régions que les taux d'UCLG restent diminués 40 jours après l'arrêt du traitement. Au contraire, dans l'aire réticulée de la substance noire, la densité des récepteurs qui est également de 60 femtomoles de flunitrazépam-(³H)/mg de tissu à la naissance, n'augmente que lentement au cours du développement pour atteindre à 25 jours des valeurs de l'ordre de 130 femtomoles de flunitrazépam-(³H)/mg de tissu. Or, dans cette structure, aucune variation significative de l'UCLG n'a été observée au stade de 60 jours, indiquant que cette structure est restée relativement insensible à l'exposition au DZ, peut-être du fait de la faible densité de récepteurs lors de la période de traitement.

4.2. Corrélation entre les effets régionaux du diazépam sur l'utilisation cérébrale de glucose et sur l'ontogenèse des récepteurs aux benzodiazépines.

Il semble également difficile d'établir une relation directe entre les effets à court et à long terme d'une exposition chronique précoce au DZ sur le métabolisme cérébral et sur l'ontogenèse des récepteurs aux BZD, les résultats des différentes études concernant les récepteurs réalisées à ce jour étant variables selon la dose et la période de traitement. Dans certains cas, un traitement prénatal au DZ ou au CDP induit une diminution à long terme de la densité des récepteurs aux BZD dans le cortex, l'hypothalamus, le thalamus et le cervelet sans que leur affinité soit modifiée (Avnimelech-Gigus et coll., 1986 ; Livezey et coll., 1986a,

1986b) alors que dans d'autres cas, le nombre et l'affinité des récepteurs ne sont pas modifiés (Kellogg, 1988). D'autre part, une seule étude met en évidence une diminution transitoire du nombre des récepteurs aux BZD dans le cervelet chez des animaux âgés de 28 jours et traités au DZ (1 mg/kg) du 7ème au 20ème jour de vie postnatale (Rothe et Bigl, 1989), ce nombre redevenant comparable à celui des témoins au bout de 3 mois de vie postnatale. Au contraire, Shibuya et coll. (1986) montrent une augmentation de la densité des récepteurs au stade de 90 jours après une exposition chronique au DZ du 1er au 10ème jour de vie postnatale mais à la dose de 20 mg/kg/jour.

5. ROLE DU VEHICULE DE LA PREPARATION INJECTABLE DANS LES EFFETS DU DIAZEPAM SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE CEREBRAL

Du fait de la faible solubilité du DZ dans l'eau, la formulation de cette BZD dans une solution injectable nécessite l'utilisation de différents solvants comme le propylène glycol (PG) (40%), l'éthanol (10%) et l'alcool benzylique (1,5%). Cette préparation est tamponnée à un pH de 6,4 grâce à un mélange tampon de benzoate de sodium et d'acide benzoïque à 5 %.

L'administration intraveineuse ou intramusculaire de DZ n'a pour conséquence que des effets locaux, à savoir une douleur au point d'injection ainsi que des lésions vasculaires et musculaires au niveau local (Shah et coll., 1991). Ces effets indésirables sont attribués aussi bien au DZ lui-même qu'au constituant majeur de cette préparation injectable, le PG (Shah et coll., 1991). Il est donc raisonnable de se poser la question de l'innocuité de ces solvants et du rôle qu'ils peuvent jouer dans les effets pharmacologiques du DZ testés dans les études animales.

Dans notre étude, l'administration de véhicule pendant les 21 premiers jours de vie postnatale n'induit par rapport au même traitement pratiqué avec du NaCl, aucune modification de la croissance pondérale des animaux. Par contre, Carl et Smith (1989) rapportent une diminution de près de 50 % du gain de poids corporel chez des rats adultes traités quotidiennement avec du PG pendant 10 jours. Cependant, cette différence par rapport à notre étude est sans aucun doute liée aux doses de PG administrées. Le volume de PG injecté tous les jours dans notre étude n'est que de quelques microlitres alors qu'il est de 8 ml/kg dans le travail de Carl et Smith (1989).

Les effets régionaux du véhicule de la préparation injectable de DZ sur l'utilisation locale de glucose par rapport au NaCl restent limités au cours de la période de traitement. En effet, le véhicule ne provoque pas de modification des taux de métabolisme énergétique dans l'ensemble des territoires cérébraux étudiés à 10 jours. Puis, il induit une augmentation significative de l'UCLG dans 9 structures cérébrales à 14 jours de vie postnatale et une

diminution dans 5 régions du cerveau à l'âge de 21 jours. Les structures principalement affectées sont les aires postérieures du système extrapyramidal moteur à 14 jours et les noyaux gris pontiques aux 2 stades. Nos résultats semblent donc confirmer ceux de Lista et coll. (1990) qui ont décrit l'absence d'effets de ce véhicule sur l'activité électrique des neurones de la voie sérotoninergique ascendante qui relie les noyaux du raphé à l'hippocampe chez le rat adulte après 3 semaines de traitement. Par ailleurs, le PG est décrit comme n'ayant aucune activité biologique par lui-même et comme étant un solvant tout à fait adéquat pour la solubilisation de molécules insolubles dans l'eau (Crankshaw et Raper, 1971 ; Löscher et coll., 1990). Ainsi, le PG ne provoque aucune modification du seuil des convulsions induites par les électrochocs ou le PTZ chez la souris et n'altère en aucune façon l'action anticonvulsivante de certaines drogues comme la primidone (Löscher et coll., 1990).

Par contre, administré à une dose plus élevée (8 ml/kg toutes les 8 heures) pendant 10 jours chez le rat adulte, le PG possède des propriétés protectrices vis-à-vis des convulsions induites par l'hexafluorodiéthyléther comparativement à l'administration de NaCl (Carl et Smith, 1989). De même, le PG est un alcool qui peut être toxique chez l'homme lorsqu'il est administré à des concentrations élevées, pouvant entraîner une hyperosmolarité, une hémolyse et une acidose lactique (Bedicheck et Kirschbaum, 1991). Il est d'ailleurs retrouvé en quantité non négligeable dans le liquide céphalo-rachidien chez des patients ayant reçu une administration aiguë de phénytoïne et de DZ, bien que les doses théoriques de PG qui ont été injectées soient relativement faibles (1,5 à 2,0 mmol/kg) (Petroff et coll., 1986).

A long terme, soit 39 jours après l'arrêt du traitement, les résultats de notre étude montrent que les taux d'UCLG mesurés chez les animaux traités avec le véhicule sont significativement augmentés dans 11 structures cérébrales par rapport au NaCl. Il s'agit des corps genouillés, de certaines aires corticales limbiques, des noyaux gris pontiques et des 3 régions de matière blanche étudiées, le genou du corps calleux, la capsule interne et la matière blanche du cervelet. Il semble donc que le véhicule possède à long terme une activité biologique qui lui est propre et qui semble être la conséquence d'un phénomène d'accumulation suite à l'administration chronique de différents alcools à faible dose au cours du développement postnatal.

Les structures de matière blanche sont constituées de fibres nerveuses myélinisées, regroupées en faisceaux et issues des corps cellulaires localisés dans la substance grise (Guyton, 1989). La myélinisation est le processus le plus tardif intervenant dans les phénomènes de croissance du cerveau (Morgane et coll., 1992). Elle est entièrement postnatale chez le rat et démarre au début de la 2ème semaine de vie postnatale pour finir vers l'âge de 25 jours (Norton et Poduslo, 1973 ; Wiggins, 1982, 1986). L'administration de véhicule qui survient au cours de cette phase de myélinisation semble donc perturber le développement de ce processus avec pour conséquence à long terme des hausses de l'activité fonctionnelle dans les aires de matière blanche. Nos résultats semblent être confirmés par

ceux de Zimmerberg et Mickus (1990) qui ont montré qu'une exposition périnatale à l'éthanol induit à long terme chez le rat une réduction de la taille du corps calleux. De même, l'éthanol provoque une diminution de la prolifération des astrocytes de foetus de rat mis en culture ainsi qu'une baisse de leurs capacités métaboliques (Guerry et coll., 1990). Ces résultats montrent donc que l'administration d'alcools au cours de la période de développement peut induire des modifications morphologiques et métaboliques au niveau cérébral qui touchent la matière blanche comme la matière grise.

En conclusion, le véhicule semble avoir une action sur le niveau de l'activité fonctionnelle cérébrale qui semble rester relativement limité à court et à long terme. Cependant, nos résultats montrent qu'il s'avère nécessaire d'étudier les effets propres de ce type de solvants administré lors d'une période critique du développement cérébral pour pouvoir dissocier les effets dus aux solvants de ceux inhérents à la molécule qui est testée, ici le DZ. En effet, chez l'adulte, le véhicule induit une augmentation de 11 % de l'UCLG dans l'aire CA1 de l'hippocampe et de 10-15 % dans les différents noyaux des corps mammillaires alors que le DZ provoque des baisses de l'activité fonctionnelle, respectivement, de 20 et 20-25 % dans les mêmes structures au même âge, ce qui montre que le véhicule semble intervenir en partie dans les effets à long terme d'une exposition chronique précoce au DZ sur le métabolisme énergétique cérébral.

CONCLUSION GENERALE

1. CONCLUSIONS

Cette étude montre que le métabolisme énergétique cérébral n'est sensible à une exposition chronique au DZ qu'aux stades les plus immatures du développement, c'est-à-dire jusqu'à 14 jours de vie postnatale. La réduction des effets métaboliques du DZ entre 14 et 21 jours d'âge postnatal suggère l'apparition d'une tolérance au DZ, ce que semble confirmer l'observation des animaux au cours de la période de traitement. Cependant, ces résultats peuvent également être le reflet d'une réduction de près de la moitié des taux plasmatiques et cérébraux de DZ au cours de la même période. Les perturbations du métabolisme énergétique cérébral enregistrées au cours du développement sont bien corrélées aux retards du développement neuromoteur qui ont été observés pendant la même période, ce qui confirme les observations faites chez le nouveau-né humain.

D'autre part, il semble que les effets à court terme du DZ sur la croissance cérébrale ne soit pas liée à une sous-nutrition qui résulterait de la sédation qui est induite par cette drogue.

A long terme, l'administration chronique précoce de DZ induit une dépression de l'activité fonctionnelle dans des structures cérébrales comme l'hippocampe, le septum ou les corps mammillaires où des récepteurs aux BZD ont été localisés en quantité importante dès la naissance. De plus, ces structures sont largement impliquées dans la mémoire et l'anxiété. Dans notre étude, le DZ induit à long terme des modifications des performances des animaux dans les tests d'apprentissage et de mémorisation et diminue le niveau d'anxiété dans les tests d'exploration, ce qui confirme les baisses des taux de métabolisme que nous avons observées dans les structures précitées.

Il semble donc que le DZ, administré au cours des premières semaines de vie postnatale, entraîne un retard global du développement cérébral qui serait responsable à long terme d'altérations fonctionnelles, irréversibles ou non, du SNC.

Administré au cours de la phase active de croissance du cerveau, le DZ pourrait donc perturber, par ses effets dépresseurs sur le métabolisme énergétique cérébral, la maturation de différentes voies nerveuses, et plus particulièrement de la neurotransmission GABAergique. En effet, le GABA joue un rôle essentiel dans les processus de synaptogénèse et a une action

modulatrice sur le fonctionnement d'autres systèmes de neurotransmission comme les systèmes cholinergique ou noradrénergique.

Ces résultats confirment donc la grande sensibilité du cerveau immature à des agressions de type médicamenteux et posent la question des effets d'une exposition prolongée aux BZD sur le développement cérébral de l'enfant, que ce soit au cours de leur utilisation clinique dans le traitements des convulsions néonatales ou au cours de leur consommation abusive lors de la grossesse et/ou de la période d'allaitement.

2. COMPARAISON AVEC LES EFFETS D'UNE EXPOSITION CHRONIQUE POSTNATALE AU PHENOBARBITAL

Nos résultats indiquent que les effets à court et à long terme du DZ semblent nettement moins délétères que ceux obtenus avec d'autres drogues anticonvulsivantes comme le PhB.

Ainsi, avec le PhB, la biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose (Pereira de Vasconcelos et Nehlig, 1987), le prélèvement cérébral de glucose (Schroeder et coll., 1991) ainsi que les taux locaux d'utilisation de glucose (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a) sont fortement déprimés au cours de la période de traitement, ces baisses étant compensées par un utilisation accrue des composés cétoniques pendant la même période (Pereira de Vasconcelos et coll., 1987 ; Schroeder et coll., 1991).

A l'inverse, le DZ n'induit pas de modifications de la balance énergétique cérébral au cours du développement postnatal (Schroeder et coll., 1994a) et n'a des effets déprimeurs sur le métabolisme cérébral qu'au cours des 2 premières semaines de vie postnatale (Schroeder et coll., 1994a, 1994b).

A long terme, le PhB provoque également une réduction massive des taux d'UCLG dans l'ensemble des systèmes cérébraux étudiés (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990a) alors que le DZ n'a que des effets partiels et localisés dans des structures qui sont normalement affectées par les BZD quand elles sont utilisées en traitement aigu chez l'adulte (Schroeder et coll., 1990b). Sur le plan comportemental, le PhB induit une nette diminution de l'activité locomotrice dans un open-field ainsi que des capacités d'apprentissage et de mémorisation dans un labyrinthe en T (Pereira de Vasconcelos et coll., 1990b). Contrairement au PhB, le DZ induit à long terme un état chronique d'hyperexcitabilité que semblent traduire les effets anxiolytique et désinhibiteur de cette molécule dans la boîte à 2 compartiments et qui pourrait expliquer les effets discordants du DZ sur la mémoire dans le labyrinthe en T et le labyrinthe à 8 branches (Schroeder et coll., 1994c).

Ces résultats indiquent donc que les barbituriques ont une toxicité plus importante que les BZD sur le cerveau immature. Ils vont ainsi dans le même sens que ceux des études histologiques qui ont montré que le PhB est non seulement capable de perturber la différenciation neuronale, mais également de détruire des neurones déjà formés (Yanai et Bergman, 1981 ; Yanai et coll., 1979). Par contre, le DZ ne provoque des dommages au niveau cérébral que lorsqu'il est administré au début de la gestation, c'est-à-dire à un moment où s'effectue la différenciation neuronale (Frieder et coll., 1984b).

PERSPECTIVES

Nos travaux concernant les effets comportementaux à long terme du DZ sont encore en cours à l'heure actuelle.

L'étude détaillée des bandes vidéo du test social de la "piscine" devrait permettre d'évaluer l'influence du DZ sur la différenciation entre les rats autonomes et les ravitailleurs ainsi que sur le comportement social des animaux de manière à confirmer ou non les observations du groupe de File (File et Tucker, 1983 ; File, 1986a, 1986b, 1986c). D'autre part, il paraît indispensable de poursuivre l'expérimentation avec le labyrinthe en T en répétant le test sur 5 jours avec et sans délai entre les 2 essais, de manière à pouvoir préciser effectivement l'action à long terme de l'administration précoce de DZ sur la mémoire et confirmer ou non les résultats obtenus dans le labyrinthe à 8 branches.

Tout au long de l'étude de comportement, les animaux ont été identifiés individuellement, ce qui nous permet de connaître pour chaque rat, sa croissance corporelle et ses performances dans l'ensemble des tests qui ont été pratiqués. Il est donc envisageable, par des moyens statistiques proches de ceux utilisés en épidémiologie, de voir s'il existe une relation entre les effets comportementaux précoces et à plus long terme du DZ et s'il est possible d'établir un caractère prédictif sur l'avenir neurocomportemental des individus exposés au DZ à partir des données recueillies dans les tests effectués au cours du développement. Cette relation existe et vient d'être démontrée par Desor (1994) et Toniolo-Kulinicz (1994) pour le rat Wistar pris dans des conditions physiologiques.

D'autres perspectives peuvent être également envisagée dans un avenir plus lointain :

- Les perturbations métaboliques observées à la suite de l'administration chronique de DZ est sans aucun doute la résultante de la fixation de cette molécule sur son récepteur. Il serait donc intéressant d'étudier, dans notre modèle d'exposition au DZ, l'ontogenèse des récepteurs aux BZD tant sur le plan de la densité des récepteurs que de l'affinité, dans le but de localiser les régions où se fixe préférentiellement le DZ en fonction du stade de développement et de voir s'il existe une corrélation avec les effets métaboliques précédemment observés.

- Il semble que les BZD administrées en période néonatale agissent sur la maturation cérébrale en perturbant la transmission GABAergique par le biais de la fixation sur leurs récepteurs. Or, Rovira et Ben Ari (1991) rapportent que les récepteurs des BZD et ceux du GABA ne sont pas totalement fonctionnels au cours des premiers jours de la vie postnatale et que le couplage entre ces 2 types de récepteurs est modifié au cours du développement postnatal. On peut alors se poser la question des effets d'un traitement chronique au DZ sur l'évolution de ce couplage et des conséquences que cela peut avoir sur le développement de la transmission GABAergique.

Un autre aspect intéressant serait d'étudier les effets de ce traitement sur les récepteurs centraux aux BZD de type I et II dont la maturation et le rôle physiologique, particulièrement dans les phénomènes convulsifs, sont différents.

- Des études morphologiques seraient également à envisager dans le but de savoir quelle peut être l'origine du retard de croissance cérébrale induit par le DZ. Ce traitement entraîne-t-il, comme le PhB, des destructions dans certaines populations cellulaires ou bien a-t-il pour conséquence une réduction du volume cellulaire et dans ce cas, du contenu en ADN du noyau ? De même, la population neuronale est-elle la seule à être éventuellement affectée ou d'autres populations comme les cellules gliales sont-elles également sensibles à ce type de traitement ?

- L'étude des effets de ce traitement sur les taux cérébraux de synthèse protéique au niveau régional par autoradiographie quantitative à la méthionine-(³⁵S) ainsi que sur la synthèse des ARN_m codant pour différentes protéines telles que les différentes sous-unités des récepteurs aux BZD pourrait également être envisagée. En effet, la synthèse protéique est reliée à des modifications à long terme de l'activité fonctionnelle cérébrale et reflète plutôt l'induction de certains gènes spécifiques qui jouent un rôle important à la fois dans le développement et la plasticité cérébrale (Nehlig et coll., 1991). On peut alors supposer que l'administration de DZ en période périnatale puisse induire des perturbations au niveau moléculaire qui se traduiraient à long terme par des modifications des capacités de synthèse des cellules.

D'autre part, les effets du DZ sur la biosynthèse des acides aminés cérébraux et les taux d'utilisation de glucose pose la question des conséquences de ce type de traitement sur les propriétés des transporteurs membranaires du glucose et des acides aminés et la synthèse de ces transporteurs.

BIBLIOGRAPHIE

Aaltonen L., Erkkola R., Kanto J. (1983) Benzodiazepine receptors in the human fetus. *Biol. Neonate* 44 : 54-57.

Ableitner A., Herz A. (1987) Changes in local cerebral glucose utilization induced by the β -carbolines FG 7142 and DMCM reveal brain structures involved in the control of anxiety and seizure activity. *J. Neurosci.* 7 : 1047-1055.

Ableitner A., Wüster M., Herz A. (1985) Specific changes in local cerebral glucose utilization in the rat brain induced by acute and chronic diazepam. *Brain Res.* 359 : 49-46.

Adams P.E. (1982) Effects of prenatal chlordiazepoxide exposure on rat preweaning and postweaning behavior. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 4 : 279-282.

Agrawal H.C., Davis J.M., Himwich W.A. (1966) Postnatal changes in free amino acid pool of rat brain. *J. Neurochem.* 13 : 607-615.

Aldinio C., Balzano M., Savoini G., Leon A., Toffano G. (1981) Ontogeny of ^3H -diazepam binding sites in different rat brain area. Effect of GABA. *Dev. Neurosci.* 4 : 461-466.

Altman J. (1982) Morphological development of the rat cerebellum and some of its mechanisms. In : *The cerebellum - new vistas*, Palay S.L., Chan-Palay V., eds, Springer Verlag, Berlin, pp. 8-49.

Altman J., Sudarshan K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.* 23 : 896-920.

Ammassari-Teule M., Pavone F., Castellano C., McGaugh J.L. (1991) Amygdala and dorsal hippocampus lesions block the effects of GABAergic drugs on memory storage. *Brain Res.* 551 : 104-109.

André M., Sibout M., Petry J.M., Vert P. (1973) Dépression respiratoire et neurologique chez le prématuré nouveau-né de mère traitée par diazépam. *J. Gyn. Obst. Biol. Repr.* 2 : 357-366.

Arolfo M., Brioni J.D. (1991) Diazepam impairs place learning in the Morris water maze. *Behav. Neural Biol.* 55 : 131-136.

Avnimelech-Gigus N., Feldon J., Tanne Z., Gavish M. (1986) The effects of prenatal chlordiazepoxide administration on avoidance behavior and benzodiazepine receptor density in adult albino rats. *Eur. J. Pharmacol.* 129 : 185-188.

Bacon E., De Barry J., Gombos G. (1991) Differential ontogenesis of type I and II benzodiazepine receptors in mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.* 58 : 283-287.

- Bacon E., De Barry J., Gombos G. (1991) Differential ontogenesis of type I and II benzodiazepine receptors in mouse cerebellum. *Dev. Brain Res.* 58 : 283-287.
- Bacon E., Viennot F. (1990) Le système complexe des récepteurs GABA/benzodiazépine. *Médecine/Sciences* 6 : 770-777.
- Bacon E., Viennot F. (1991) La chimie de l'anxiété. *La Recherche* 22 : 1424-1431.
- Baestrup C., Nielsen M. (1978) Ontogenetic development of benzodiazepine receptors in the brain. *Brain Res.* 147 : 170-173.
- Baillet J., Nortier E. (1992) *Précis de Physiologie Humaine*, Ellipse, Paris.
- Balasse E.O. (1971) Effect of free fatty acids and ketone bodies on glucose uptake and oxidation in the dog. *Horm. Metab. Res.* 3 : 403-409.
- Balazs R. (1970) Carbohydrate metabolism. In : *Handbook in Neurochemistry*, Lajtha A., ed., Plenum Press, New York, pp. 1-36.
- Baldy-Moulinier M. (1984) Benzodiazépines et épilepsie. In : *Benzodiazépines, de la recherche à la clinique*. Colloque Roche, Montpellier, 22 mai 1984.
- Balter M.B., Levine J., Manheimer D.I. (1974) Cross-national study of the extent of antianxiety sedative drug use. *N. Engl. J. Med.* 290 : 769-774.
- Barbier P., Breteau J., Autret E., Bertrand P., Foussard-Blampin O., Breteau M. (1991) Effects of prenatal exposure to diazepam on exploration behavior and learning retention in mice. *Dev. Pharmacol. Ther.* 17 : 35-43.
- Barnes C.A. (1988) Spatial learning and memory processes : the search for their neurobiological mechanisms in the rat. *TINS* 11 : 163-169.
- Basco E., Hajos F., Fulop Z. (1977) Proliferation of Bergmann glia in the developing rat cerebellum. *Anat. Embryol.* 151 : 219-222.
- Basu T.K., Dickerson J.W.T., Parke D.V.W. (1971) Effect of development on the activity of microsomal drug-metabolizing enzymes in rat liver. *Biochem.J.* 124 : 19-24.
- Bavoux F., Lanfranchi C., Olive G., Asensi D., Dulac O., Franconal C., Huault G., Olivier C., Seilaniantz C., Castot A., Medernach C., Benzaken C., Efthymiou, M.C. (1981) Grossesse et psychotropes : effets indésirables chez le nouveau-né. *Thérapie* 36 : 305-312.
- Bayer S.A., Brunner R.L., Hine R., Altman J. (1973) Behavioral effects of interference with the postnatal acquisition of hippocampal granule cells. *Nature* 242 : 222-224.
- Bayer S.A., McMurray W.C. (1967) The metabolism of amino acids in developing rat brain. *J. Neurochem.* 14 : 695-706.
- Beatty W.W., Shavalia D.A. (1980) Spatial memory in rats : time course of working memory and effect of anesthetics. *Behav. Neural Biol.* 28 : 454-462.
- Bedichek E., Kirschbaum B. (1991) A case of propylene glycol toxic reaction associated with etomidate infusion. *Arch. Intern. Med.* 151 : 2297-2298.
- Bekoff A., Trainer W. (1979) The development of interlimb coordination during swimming in postnatal rats. *J. Exp. Biol.* 83 : 1-11.

Bellantuono C., Reggi V., Tognoni G., Garattini S. (1980) Benzodiazepines : clinical pharmacology and therapeutic use. *Drugs* 19 : 195-219.

Benjamins J.A., McKhann G.M. (1981) Development, regeneration and aging of the brain. In : *Basic Neurochemistry*, 3rd edition, Siegel G.J., Albers R.W, Agranoff B.W., Katzman R., Eds., Little & Brown, Boston, pp. 445-469.

Benton D., Dalrymple-Alford J.C., Brain P.F., Grimm V. (1985) Prenatal administration of diazepam improves radial maze learning in mice. *Comp. Biochem. Physiol.* 80 : 276-275.

Beracochea D.J., Krazem A. (1991) Effects of mammillary body and mediodorsal thalamic lesions on elevated plus maze exploration. *Neuroreport* 2 : 793-796.

Berger B., Verney C. (1984) Development of the catecholaminergic innervation in rat neocortex : morphological features. In : *Monoamine innervation of cerebral cortex*, Descaries L., Reader T.R., Jasper H.H., eds, Liss, New York, pp. 95-121.

Bergman U., Dahlström M. (1988) Anxiety and antianxiety drug use in Sweden. In : *Workshop "Pharmacological treatment of anxiety"*. National Board Health and Welfare and Drug Information Committee (Eds.), pp. 63-74.

Berlyne D.E. (1960) *Conflict, Arousal and Curiosity*. McGraw Hill, New York.

Bignall K.E. (1974) Ontogeny of levels of neural organization : the righting reflex as a model. *Exp. Neurol.* 42 : 556-573.

Bilger A., Nehlig A. (1991) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. I. Cytochrome oxidase and lactate deshydrogenase. *Int. J. Devl. Neurosci.* 9 : 545-553.

Bilger A., Nehlig A. (1992) Quantitative histochemical changes in enzymes involved in energy metabolism in the rat brain during postnatal development. II. Glucose-6-phosphate deshydrogenase and β -hydroxybutyrate deshydrogenase. *Int. J. Devl. Neurosci.* 10 : 143-152.

Bolles R.C., Woods P.J. (1964) The ontogeny of behaviour in the albino rat. *Anim. Behav.* 12 : 427-441.

Bômont L., Bilger A., Boyet S., Vert P., Nehlig A. (1992) Acute hypoxia induces specific changes in local cerebral glucose utilization at different postnatal ages in the rat. *Dev. Brain Res.* 66 : 33-45.

Bossard N., Evrard M.C., Descotes J., Evreux J.C. (1987) Benzodiazépines et grossesse. *Lyon Pharmaceutique* 38 : 281-283.

Bourin M., Hascoet M. (1992) Le récepteur GABA_A et les récepteurs aux benzodizépines. *La Lettre du Pharmacologue* 6 : 60-64.

Bowers M.B., Hoffman F.J., Morton J.B. (1991) Diazepam and haloperidol : effect on regional brain homovanillic acid levels. *Neuropsychopharmacology* 5: 65-69.

Bowery N.G., Price G.W., Hudson A.L., Hill D.R., Wilkin G.P., Turnbull M.J. (1984) GABA receptor multiplicity. Visualization of different receptor types in the mammalian CNS. *Neuropharmacology* 23 : 219-231.

Briley M., Chopin P., Moret C. (1992) Effect of serotonergic lesion on "anxious" behaviour measured in the elevated plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology* 101 : 187-189.

Brioni J.D., Decker M.W., Gamboa L.P., Izquierdo I., McGaugh J.L. (1990) Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. *Brain Res.* 522 : 227-234.

Brioni J.D., Nagahara A.H., McGaugh J.L. (1989) Involvement of the amygdala GABAergic system in the modulation of memory storage. *Brain Res.* 487 : 105-112.

Bristow D.R., Martin I.L. (1988) Light microscopic autoradiographic localization in rat brain of the binding sites for the GABA_A receptor antagonist [³H]SR-95531 : comparison with the [³H]GABA_A receptor distribution. *Eur. J. Pharmacol.* 148 : 283-288.

Brito G.N.O., Davis B.J., Stopp L.C., Stanton M.E. (1983) Memory and the septohippocampal system in the rat. *Psychopharmacology* 81 : 315-320.

Brown M.F. (1990) The effects of maze arm length on performance in the radial-arm maze. *Anim. Learn. Behav.* 18 : 13-22.

Brown M.F. (1992) Does a cognitive map guide choices in the radial-arm maze ? *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proc.* 18 : 56-66.

Brunel P., Vial T., Evreux J.C. (1990) L'effet amnésiant des benzodiazépines. *Lyon Pharmaceutique* 41 : 513-516.

Burdette D.E. (1990) Benzodiazepines. In : *Comprehensive epileptology*. Dam M., Gram L., eds., Raven Press, New York, pp. 547-561.

Busch H., Fujiwara E., Keer L.M. (1960) Metabolic patterns for glucose-(1-¹⁴C) in tissues of tumor-bearing rats. *Cancer. Res.* 20 : 50-57.

Cagiano R., De Salvia M.A., Persichella M., Renna G., Tattoli M., Cuomo V. (1990) Behavioural changes in the offspring of rats exposed to diazepam during gestation. *Eur. J. Pharmacol.* 177 : 67-74.

Calvino B., Rivot J.P., Peschanski M. (1991) Neurobiologie des comportements : approche expérimentale. *Médecine/Sciences* 7 : 72-73.

Campbell B.A., Lytle L.D., Fibiger H.C. (1969) Ontogeny of adrenergic arousal and cholinergic inhibitory mechanisms in the rat. *Science* 166 : 635-637.

Carl G.F., Smith M.L. (1989) Chronic carbamazepine treatment in the rat : efficacy, toxicity and effect on plasma and tissue folate concentrations. *Epilepsia* 30 : 217-224.

Carmaux V. (1987) Disrégulations du comportement alimentaire et système hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. Etude chez le sujet humain. *Rapport de stage dans le cadre du DEA "Régulations physiologiques et comportementales"*. Université de Strasbourg I.

Chapman A.G., Nordstrom C.H., Siesjö B.K. (1978) Influence of phenobarbital anesthesia on carbohydrate and amino acid metabolism in rat brain. *Anesthesiology* 48 : 175-182.

Chapouthier G., Raffalli-Sebille M.J., Venault P., Simiand J., Dodd R.H. (1991) Comparison between the effects of the benzodiazepine receptor ligands methyl β -carboline-3-carboxylate and diazepam in two learning situations in mice. *Psychobiology* 19 : 58-63.

Chen Z.W., Agerberth B., Gell K. et coll. (1988) Isolation and characterization of porcine diazepam-binding inhibitor, a polypeptide not only of cerebral occurrence but also common in intestinal tissues and with effects on regulation on insulin release. *Eur. J. Biochem.* 174 : 239-245.

Cheramy A., Nieoullon A., Glowinski J. (1978) GABAergic processes involved in the control of dopamine release from nigro-striatal dopaminergic neurons in the cat. *Eur. J. Pharmacol.* 48 : 281-295.

Chesseley M.F. (1985) Presynaptic regulation of transmitter release in the brain. *Neuroscience* 12 : 347.

Chisholm J., Kellogg C., Lippa A (1983) Development of benzodiazepine binding subtypes in three regions of rat brain. *Brain Res.* 267 : 388-391.

Cocks J.A., Balazs R., Johnson A.L., Eayrs J.T. (1970) Effect of thyroid hormone on biochemical maturation of the rat brain : conversion of glucose-carbon into amino acids. *J. Neurochem.* 17 : 1275-1285.

Cole J.O., Chiarello R.J. (1990) The benzodiazepines as drugs of abuse. *J. Psychiatr. Res.* 24 (suppl. 2) : 135-144.

Colin C., Desor D. (1986) Différenciations comportementales dans des groupes de rats soumis à une difficulté d'accès à la nourriture. *Behav. Proc.* 13 : 85-100.

Collignon A. (1988) Maturation du métabolisme énergétique chez le rat au cours du développement postnatal : influence d'un traitement chronique précoce au diazépam. *D.E.A. de Biologie Appliquée à la Nutrition et aux Bioindustries*. Université de Nancy I.

Cooper S.J. (1985) Bidirectional control of palatable food consumption through a common benzodiazepine receptor : theory and evidence. *Brain Res. Bull.* 15 : 397-410.

Cooper S.J. (1986) β -carboline characterized as benzodiazepine receptor agonists and inverse agonists produce bi-directional changes in palatable food consumption. *Brain Res. Bull.* 17 : 627-637.

Costall B., Kelly M.E., Naylor R.J., Onaivi E.S. (1988) Actions of buspirone in a putative model of anxiety in the mouse. *J. Pharm. Pharmacol.* 40 : 494-500.

Crane P.D., Braun L.D., Cornford E.M., Cremer J.E., Glass J.M., Oldendorf W.H. (1978) Dose dependent reduction of glucose utilization by pentobarbital in rat brain. *Stroke* 9 : 12-18.

Crane P.D., Pardridge W.M., Braun L.D., Nyerges A.M., Oldendorf W.H. (1981) The interaction of transport and metabolism on brain glucose utilization : a reevaluation of the lumped constant. *J. Neurochem.* 36 : 1601-1604.

Crankshaw D.P., Raper C. (1971) The effects of solvents on the potency of chlordiazepoxide, diazepam, medazepam and nitrazepam. *J. Pharm. Pharmac.* 23 : 313-321.

Crawley J, Goodwin F.K. (1980) Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 : 167-170.

Crawley J.N. (1981) Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioral action of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15 : 695-699

Crawley J.N. (1985) Exploratory behavior models of anxiety in mice. *Neurosc. Behav. Rev.* 9 : 37-44.

Cremer J.E., Heath D.F. (1974) The estimation of rates of utilisation of glucose and ketone bodies in the brain of the suckling rat using compartmental analysis of isotopic data. *Biochem. J.* 142 : 527-544.

Critchley M.A.E., Njung'e K., Handley S.L. (1992) Actions and some interactions of 5-HT_{1a} ligands in the elevated X-maze and effects of dorsal raphe lesions; *Psychopharmacology* 106 : 484-490.

Cruce J.A.F. (1975) An autoradiographic study of the projections of the mammillothalamic tract in the rat. *Brain Res.* 85 : 211-219.

Crusio W.E., Schwegler H., Lipp H.P. (1990) Radial-maze performance and structural variation of the hippocampus in mice : correlation with mossy fibre distribution. *Brain Res.* 425 : 182-185.

Cuomo V. (1987) Perinatal neurotoxicology of psychotropic drugs. *TIPS* 8 : 346-350.

Curran H.V. (1991) Benzodiazepines, memory and mood : a review. *Psychopharmacology* 105 : 1-8.

Dahlquist G., Persson B. (1976) Effect of intrauterine growth retardation on the postnatal development of D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase activity in rat brain. *Biol. Neonate* 28 : 353-364.

Dahlquist G., Persson U., Persson B. (1972) The activity of D-β-hydroxybutyrate dehydrogenase in fetal infant and adult rat brain and the influence of starvation. *Biol. Neonate* 20 : 40-52.

Daval J.L., Pereira de Vasconcelos A., Lartaud I. (1988) Morphological and neurochemical effects of diazepam and phenobarbital on selective culture of neurons from fetal rat brain. *J. Neurochem.* 50 : 665-672.

Daval J.L., Werck M.C., Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A. (1991) Quantitative autoradiographic study of the postnatal development of benzodiazepine binding sites and their coupling to GABA receptors in the rat brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9 : 307-320.

Davidson A.N., Dobbing J. (1968) The developing brain. In : *Applied Neurochemistry*. Davidson A.N., Dobbing J., eds, Blackwell, Oxford, pp. 253-280.

Davis D., Gallagher D.W. (1988) Continuous slow release of low levels of diazepam produces tolerance to its depressant and anxiolytic effects on the startle reflex. *Eur. J. Pharmacol.* 150 : 23-29.

Davis M. (1992) The role of amygdala in fear and anxiety. *Annu. Rev. Neurosci.* 15 : 353-375.

De Wit H., Metz J., Wagner N., Cooper M. (1991) Effects of diazepam on cerebral metabolism and mood in normal volunteers. *Neuropsychopharmacology* 5 : 33-41.

Dennis T., Dubois A., Benavides J., Scatton B. (1988) Distribution of central ω_1 (benzodiazepine₁) and ω_2 (benzodiazepine₂) receptor subtypes in the monkey and human brain. An autoradiographic study with [³H]flunitrazepam and the ω_1 selective ligand [³H]zolpidem. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 247 : 309-322.

Desor D. (1979) Application d'une batterie de tests du développement moteur et d'une méthode de conditionnement d'évitement à la lumière à l'étude des effets de la diphénylhydantoïne chez le rat. *Thèse de 3ème cycle*. Université de Nancy I.

Desor D. (1994) Différenciations comportementales dans des groupes de rats confrontés à une difficulté d'accès à la nourriture. *Thèse d'Etat*. Université de Nancy I.

Desor D., Colin C., Krafft B. (1987) Assessment of drug effects in a complex social situation in the rat : the "swimming-pool" model. *Neuroscience* 22 : S360.

Deutch A.Y., Gruen R.J., Roth. R.H. (1989) The effects of perinatal diazepam exposure on stress-induced activation of the mesotelencephalic dopamine system. *Neuropsychopharmacology* 2 : 105-114.

Deviterne D. (1981) Etude des variations interindividuelles chez le rat : relations entre le développement neuro-moteur et pondéral, les performances en situation d'apprentissage et l'environnement précoce. *Thèse de 3ème Cycle*. Université de Nancy I.

DeVivo D.C., Leckie M.P., Agrawal H.C. (1973) The differential incorporation of β -hydroxybutyrate and glucose into brain glutamate in the newborn rat. *Brain Res.* 55 : 485-490.

DeVivo D.C., Leckie M.P., Agrawal H.C. (1975) D- β -hydroxybutyrate : a major precursor of amino acids in developing rat brain. *J. Neurochem.* 25 : 161-170.

Dobbing J. (1971) Undernutrition and the developing brain : the use of animal models to elucidate the human problem. *Psychiat. Neurol. Neurochir.* 74 : 433-442.

Douglas R.J. (1966) Transposition novelty and limbic lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 62 : 354-357.

Douglas R.J. (1975) The development of hippocampal function : implications for theory and therapy. In : *The Hippocampus*. Isaacson R.L., Pribram K.H., eds., Plenum Press, New York, 2 : 327-361.

Drew C.A., Johnston G.A.R., Weatherby R.P. (1984) Bicuculline-insensitive GABA receptors : studies on the binding of (-)baclofen to rat cerebellar membranes. *Neuroscience* 52 : 317-321.

Drury D.R., Wick A.N. (1952) Effect of β -hydroxybutyric acid on glucose oxidation in insulinized animals. *J. Biol. Chem.* 196 : 129-133.

Dudchenko P., Sarter M. (1992) Behavioral microanalysis of spatial delayed alternation performance : rehearsal through over behavior, and effects of scopolamine and chlordiazepoxide. *Psychopharmacology* 107 : 263-270.

Duyckaerts C., Seilhean D., Delaère P. (1991) Anatomie et mémoire. *Rev. Prat. (Paris)* 41 : 869-873.

Dymzsa H.A., Czajka D.M., Miller S.A. (1964) Influence of artificial diet on weight gain and body composition of the neonatal rat. *J. Nutr.* 84 : 100-106.

Edmond J. (1974) Ketone bodies as precursors of sterols and fatty acids in the developing rat. *J. Biol. Chem.* 249 : 72-80.

Emmanouil D.E., Quock R.M. (1990) Effects of benzodiazepine agonist, inverse agonist and antagonist drugs in the mouse staircase test. *Psychopharmacology* 102 : 95-97.

Engel J., Hard E. (1987) Effects of diazepam, ethanol and Ro 15-1788 on ultrasonic vocalization, locomotor activity and body righting in the neonatal rat. *Alcohol. Alcohol.* suppl. 1 : 709-712.

Farrell K. (1986) Benzodiazepines in the treatment of children with epilepsy. *Epilepsia* 27 (suppl. 1) : S45-S51.

Fazekas J.F., Graves F.B., Himwich H.E. (1951) Influence of thyroid on cerebral metabolism. *Endocrinology* 48 : 169-174.

Ferley J.P., Balducci F., Charrel M., Drucker J. (1988) Fréquence des troubles du sommeil et recours aux somnifères chez les habitants d'une ville moyenne : identification des facteurs associés. *Rev. Fr. Santé Publique* 41 : 24-29.

File S.E. (1986a) Effects of neonatal administration of diazepam and lorazepam on performance of adolescent rats in tests of anxiety, aggression, learning and convulsions. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 : 301-306.

File S.E. (1986b) The effects of neonatal administration of clonazepam on passive avoidance and on social, aggressive and exploratory behavior of adolescent male rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 : 447-452.

File S.E. (1986c) Behavioral changes persisting into adulthood after neonatal benzodiazepine administration in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 : 453-461.

File S.E. (1980) The use of social interaction as a method for detecting anxiolytic activity of chlordiazepoxide-like drugs. *J. Neurosc. Meth.* 2 : 219-238.

File S.E. (1985) Tolerance to the behavioral actions of benzodiazepines. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 9 : 113-118.

File S.E. (1990) One-trial tolerance to the anxiolytic effects of chlordiazepoxide in the plus-maze. *Psychopharmacology* 100 : 281-282.

File S.E. (1993) The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. *Behav. Brain Res.* 58 : 199-202.

File S.E., Baldwin H.A., Aranko K. (1987) Anxiogenic effects of benzodiazepine withdrawal are linked to the development of tolerance. *Brain Res. Bull.* 19 : 607-610.

File S.E., Mabbutt P.S., Hitchcott P.K. (1990) Characterisation of the phenomenon of "one-trial tolerance" to the anxiolytic effect of chlordiazepoxide in the elevated plus-maze. *Psychopharmacology* 102 : 98-101.

File S.E., Tucker J.C. (1984a) Lasting behavioral effects after treating rats with CGS 8216 on postnatal days 9 to 21. *Physiol. Behav.* 32 : 351-355.

File S.E., Tucker J.C. (1984b) Chronic neonatal treatment with CGS 8216 : effects on the behaviour of adolescent rats. *Behav. Brain Res.* 11 : 197-204.

File S.E., Tucker J.C. (1983) Lorazepam treatment in the neonatal rat alters submissive behavior in adulthood. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5 : 289-294.

File S.E., Wilks L.J. (1986) The effects of benzodiazepines in newborn rats suggests a function for type 2 receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25 : 1145-1148.

File S.E., Zangrossi H. (1993) "One-trial tolerance" to the anxiolytic actions of benzodiazepines in the elevated plus-maze, or the development of a phobic state ? *Psychopharmacology* 110 : 240-244.

File S.E., Zangrossi H., Viana M., Graeff F.G. (1992) Trial 2 in the elevated plus-maze : a different form of fear ? *Psychopharmacology* 29 : 381-388.

Fink J.S., Smith G.P. (1980a) Mesolimbocortical dopamine terminal fields are necessary for normal locomotor and investigatory exploration in rats. *Brain Res.* 199 : 359-384.

Fink J.S., Smith G.P. (1980b) Mesolimbic and mesocortical dopaminergic neurons are necessary for normal exploratory behavior in rats. *Neurosc. Lett.* 17 : 61-65.

Flecknell P.A., Wootton R. (1989) Cerebral blood flow and metabolism in fasting neonatal piglets. *Biol. Neonate* 55 : 275-280.

Fonnum F. (1985) Determination of transmitter amino acid turnover. In : *Neuromethods*, 3, amino acids, Boulton A.A., Baker G.B., Wood J.D., eds, Humana Press, Clifton, pp. 201-237.

Fonseca N.M., Sell A.B., Carlini E.A. (1976) Differential behavioral responses of male and female adult rats treated with five psychotropic drugs in the neonatal stage. *Psychopharmacology* 46 : 263-268.

Foreman N., Althaus M. (1992) The development of exploration and spontaneous alternation in hooded rat pups : effects of unusually early eyelid opening. *Dev. Psychobiol.* 24 : 521-537.

Foreman N., Fielder A., Price D., Bowler V. (1991) Tonic and phasic orientation in full-term and preterm infants. *J. Exp. Child Psychol.* 51 : 407-422.

Foster N.L., Van Der Spek A.F.L., Aldrich M.S., Berent S., Hichwa R.H., Sackellares J.C., Gilman S., Agranoff B.W. (1987) The effect of diazepam sedation on cerebral glucose metabolism in Alzheimer's disease as measured using positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7 : 415-420.

Frankova S., Jakoubek B. (1976) Long-term behavioral effects of diazepam and ACTH, administered early in life. *Act. Nerv. Super. (Praha)* 16 : 247-248.

Frey H.H., Jung S., Scherkl R. (1991) Monoamine turnover in the brain of mice during development of tolerance to the anticonvulsant effect of clonazepam. *Epilepsy Res.* 8 : 190-196.

Frey H.H., Löscher W. (1982) Anticonvulsant potency of unmetabolized diazepam. *Pharmacology* 25 : 154-159.

Frey H.H., Philippin H.P., Scheuler W. (1984) Development of tolerance to the anticonvulsant effect of diazepam in dogs. *Eur. J. Pharmacol.* 104 : 27-38.

Frey K.A., Holthoff V.A., Koeppe R.A., Jewett D.M., Kilbourn M.R., Kuhl D.E. (1991) Parametric in vivo imaging of benzodiazepine receptor distribution in human brain. *Ann. Neurol.* 30 : 663-672.

Frieder B., Epstein S., Grimm V.E. (1984a) The effects of exposure to diazepam during various stages of gestation or during lactation on the development and behavior of rat pups. *Psychopharmacology* 83 : 51-55.

Frieder B., Grimm V.E. (1985) Some long-lasting neurochemical effects of prenatal or early postnatal exposure to diazepam. *J. Neurochem.* 45 : 37-42.

Frieder B., Meshorer A., Grimm V.E. (1984b) The effect of exposure to diazepam through the placenta or through the mother's milk. *Neuropharmacology* 23 : 1099-1104.

Gai N., Grimm V.E. (1982) The effect of prenatal exposure to diazepam on aspects of postnatal development and behavior in rats. *Psychopharmacology* 78 : 225-229.

Gaitonde M.K., Dahl D.R., Elliot K.A.C. (1965) Entry of glucose carbon into amino acids of rat brain and liver in vivo after injection of uniformly ¹⁴C labelled glucose. *Biochem. J.* 94 : 345-352.

Gaitonde M.K., Richter D. (1966) Changes with age in the utilization of glucose carbon in liver and brain. *J. Neurochem.* 13 : 1309-1316.

Gallager D.W., Lakovski J., Gonsalves S.F., Rauch S. (1984) Chronic benzodiazepine treatment decreases postsynaptic GABA sensitivity. *Nature* 308 : 74-77.

Gallager D.W., Malcolm A.B., Anderson S.A., Gonsalves S.F. (1985) Continuous release of diazepam : electrophysiological, biochemical and behavioral consequences. *Brain Res.* 342 : 26-36.

Gallager D.W., Mallorga P., Thomas J.W. (1980) GABA-benzodiazepine interactions : physiological, pharmacological and developmental aspects. *Fed. Proc.* 39 : 3043-3050.

Gallager D.W., Marley R.J., Hernandez T.D. (1991) Biochemical and electrophysiological mechanisms underlying benzodiazepine tolerance and dependence. In : *The biological bases of drug tolerance and dependence*, Pratt J.A., ed., Academic Press, New York, pp. 49-71.

Garattini S., Mussini E., Marcucci F., Guaitani A. (1973) Metabolic studies on benzodiazepines in various animal species. In : *The Benzodiazepines*. Garattini S., Mussini E., Randall L.O., eds, Raven Press, New York, pp. 75-97.

Gardner C.R. (1985) Inhibition of ultrasonic distress vocalization in rat pups by chlordiazepoxide and diazepam. *Drug Devel. Res.* 5 : 185-193.

Garratt J.C., Gent J.P., Freely M., Haigh J.R.M. (1988) Can benzodiazepines be classified by characterising their anticonvulsant tolerance-inducing potential. *Eur. J. Pharmacol.* 145 : 75-81.

Garrett K.M., Tabakoff B. (1985) The development of type I and type II benzodiazepine receptors in the mouse cortex and cerebellum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22 : 985-992.

Gauthier G., Vercher J.L., Obrecht G., Semmlow J.L. (1994) L'adaptation aux verres correcteurs. *La Recherche* 25 : 294-302.

Gavish M., Katz Y., Bar-Ami S., Weizman R. (1992) Biochemical, physiological, and pathological aspects of the peripheral benzodiazepine receptor. *J. Neurochem.* 58 : 1589-1601.

Gelly J.L. (1978) Effet d'une sous-alimentation quantitative sur la rate et ses jeunes. Etude du développement sensori-moteur à l'aide d'une batterie cohérente de tests. *Thèse de 3ème cycle.* Université de Nancy I.

Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H. (1988a) Competition for sucrose-pellets in triads of male Wistar rats : the individual's performances are differing but stable. *Behav Brain Res.* 27 : 37-44.

Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H. (1988b) Competition for sucrose-pellets in triads of male Wistar rats : effects of three serotonergic drugs. *Prog. Neuro-Psychopharmacol.* 12 : 639-651.

Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H. (1989) Behavioral effects of yohimbine and chlordiazepoxide : dependence on the rat's previous familiarization with the test conditions. *Neuropsychobiol.* 22 : 101-107.

Gentsch C., Lichtsteiner M., Feer H. (1990) Competition for sucrose-pellets in triads of male Wistar rats : effects of acute and subchronic chlordiazepoxide. *Psychopharmacology* 100 : 530-534.

Gerfen C.R. (1992) The neostriatal mosaic : multiple levels of compartmental organization. *TINS* 15 : 133-139.

Gey K.F. (1973) Effect of benzodiazepines on carbohydrate metabolism in rat brain. In : *The benzodiazepines*, Garattini S., Mussini E., Randall L.O., eds, Raven Press, New York, pp. 243-255.

Geyer M.A., Reiter L.W. (1985) Strategies for the selection of test methods. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 7 : 661-662.

Gjedde A. (1982) Calculation of glucose phosphorylation from brain uptake of glucose analogs in vivo : a re-examination. *Brain Res. Rev.* 4 : 237-274.

Goldwitz D., Koch J. (1986) Performance of normal and neurological mutant mice on radial-arm maze and active avoidance tasks. *Behav. Neurol. Biol.* 46 : 216-226.

Gonsalves S.F., Gallager D.W. (1987) Time course for development of anticonvulsant tolerance and GABAergic subsensitivity after chronic diazepam. *Brain Res.* 405 : 94-99.

Green S., Vale A.L. (1992) Role of amygdaloid nuclei in the anxiolytic effects of benzodiazepines in rats. *Behav. Pharmacol.* 3 : 261-264.

Greenblatt D.J., Shader R.I. (1986) Long-term administration of benzodiazepines : pharmacokinetic versus pharmacodynamic tolerance. *Psychopharmacol. Bull.* 22 : 416-422.

Gregoire N.M., Gjedde A., Plum F., Duffy T.E. (1978) Cerebral blood flow and cerebral metabolic rates for oxygen, glucose and ketone bodies in newborn dogs. *J. Neurochem.* 30 : 63-69.

Grimm V.E. (1984) A review of diazepam and other benzodiazepines in pregnancy. In : *Neurobehavioral Teratology*, Yanai J., ed., Elsevier Science, Amsterdam, pp. 153-162.

Grimm V.E., Jancourt A. (1983) The effects of chronic diazepam treatment on body weight and food intake in rats. *Intern. J. Neuroscience* 18 : 127-136.

Groberty M.C., Schenk F. (1992) The influence of spatial irregularity upon radial-maze performance in the rat. *Anim. Learn. Behav.* 20 : 393-400.

Gruen R.J., Deutch A.Y., Roth. R.H. (1990) Perinatal diazepam exposure : alterations in exploratory behavior and mesolimbic turnover system. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36 : 169-175.

Grundt I.K., Rise M. (1991) Repeated exposure of glial cells in primary cultures to amitriptyline and diazepam. *A.T.L.A.* 19 : 191-193.

Guerri C., Saez R., Sancho-Tallo M., Martin de Aquilera E., Renau-Piqueras J. (1990) Ethanol alters astrocyte development : a study of critical periods using primary cultures. *Neurochem. Res.* 15 : 559-565.

Guyton A.C. (1989) *Anatomie et physiologie du système nerveux*, Vigot, Paris.

Haefely W., Kulcsar A., Möhler H., Pieri L., Polc P., Schaffner R. (1975) Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 14 : 131-151.

Haefely W.E. (1988) Benzodiazepines. *Int. Anesthesiol. Clin.* 26 : 262-272.

Hagan J.J., Jansen J., Broekkamp C. (1987) Blockade of spatial learning by the M1 muscarinic antagonist pirenzepine. *Psychopharmacology* 93 : 470-476.

Hagan J.J., Salamone J.D., Simpson J., Iversen S.D., Morris R.G.M. (1988) Place navigation in rats is impaired by lesions of medial septum and diagonal band but not nucleus basalis magnocellularis. *Behav. Brain Res.* 27 : 9-20.

Haigh J.R.M., Pullar T., Gent J.P., Dailley C., Geely M. (1986) Tolerance to the anticonvulsant effect of clonazepam in mice : no concurrent change in plasma concentration. *J. Pharm. Pharmacol.* 38 : 931-938.

Hakim A.M., Moss G., Scuderi D. (1980) The pentose phosphate pathway in brain during development. *Biol. Neonate* 37 : 15-21.

Handley S.L., Mithani S. (1984) Effects of α 2-adrenoreceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of fear-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 327 : 1-5.

Hannah R.S., Spira A.W., Roth S.H. (1989) The effects of two anticonvulsants on amino acid levels in the developing rat cerebellum. *Neurochem. Res.* 14 : 427-429.

Harris R.A., Case J. (1979) Effects of maternal consumption of ethanol, barbital or chlordiazepoxide on the behavior of the offspring. *Behav. Neural. Biol.* 26 : 234-247.

Hawkins R.A., Williamson D.H., Krebs H.A. (1971) Ketone body utilization by adult and suckling rat brain in vivo. *Biochem. J.* 122 : 13-18.

Heninger C., Saito N., Garrett K.M., Vitek M.P., Duman R.S., Gallager D.W. (1990) Effect of continuous diazepam administration on GABA_A subunit mRNA in rat brain. *J. Mol. Neurosci.* 2: 101-107.

Henke P.G. (1980) Facilitation and inhibition of gastric pathology after lesions in the amygdala of rats. *Physiol. Behav.* 25 : 575-579.

Herman J.P., Chouili J., Abrous N., Dulluc J., LeMoal M. (1988) Effects of intra-accumbens dopaminergic grafts on behavioral deficits induced by 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens or A10 dopaminergic neurons ; a comparison. *Behav. Brain Res.* 29 : 73-83.

Hers H.G. (1957) *Le métabolisme du fructose*, Editions Arscia, Brussels.

Himwich H.E. (1951) *Brain metabolism and cerebral disorders*, Williams & Wilkins, Baltimore.

Hiraga Y., Iwasaki T. (1984) Effects of cholinergic and monoaminergic antagonists and tranquilizers upon spatial memory in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 20 : 205-207.

Hitchcock J.M., Davis M. (1986) Lesions of the amygdala, but not of the cerebellum or red nucleus, block conditioned fear as measured with the potentiated startle paradigm. *Behav. Neurosci.* 100 : 11-22.

Hitchcott P.K., File S.E., Ekwuru M., Neal M.J. (1990) Chronic diazepam treatment in rats causes long-lasting changes in central [³H]5-hydroxytryptamine and [¹⁴C]γ-aminobutyric acid release. *Br. J. Pharmacol.* 99 : 11-12.

Hodges H., Green S. (1986) Effects of chlordiazepoxide on cued radial maze performance in rats. *Psychopharmacology* 88 : 460-466.

Hothersall J.S., Baquer N.J., Greenbaum A.L., McLean P. (1979) Alternative pathways of glucose utilization in brain. Changes in the pattern of glucose utilization in brain during development and the effect of phenazine methosulfate on the integration of metabolic routes. *Arch. Biochem. Biophys.* 198 : 478-492.

Hutchings D.E. (1982) Behavioural teratology : a new frontier in neurobehavioural research. In : *Teratogenesis and reproductive toxicology*. Johnson E.M., Kochar D.M., eds., Springer Verlag, Berlin, pp. 207-235.

Ide T., Steinke J., Cahill G.F. (1969) Metabolic interactions of glucose, lactate and β-hydroxybutyrate in rat brain slices. *Am. J. Physiol.* 217 : 784-792.

Insel T.R., Hill J.L., Mayor R.B. (1986) Rat pup ultrasonic isolation calls : possible mediation by the benzodiazepine receptor complex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 : 1263-1267.

Isaacson R.L. (1982) *The limbic System*. Plenum Press, New York.

Isseroff A. (1979) Limited recovery of spontaneous alternation after extensive hippocampal damage : evidence for memory impairment. *Exp. Neurol.* 64 : 284-294.

Izquierdo I., Da Cunha C., Medina J.H. (1990) Endogenous benzodiazepine modulation of memory processes. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 14 : 419-424.

Izquierdo I., Medina J.H. (1991) GABAA receptor modulation of memory : the role of endogenous benzodiazépines. *TIPS* 12 : 260-265.

Jackson W.J., Strong P.J. (1969) Differential effects of hippocampal lesions upon sequential tasks and maze learning by the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 68 : 442-450.

Jacobowitz D.M., Palkovitz M. (1974) Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase-containing neurons in the rat brain. 1. Forebrain (telencephalon, diencephalon). *J. Comp. Neurol.* 157 : 13-28.

Jolicoeur F.B., Rondeau D.B., Hamel E., Butterworth R.F., Barbeau A. (1979) Measurement of ataxia and related neurological signs in the laboratory rat. *Can. J. Neurol. Sci.* 6 : 209-215.

Joly D., Sanger D.J. (1991) Social competition in rats : a test sensitive to acutely administered anxiolytics. *Behav. Pharmacol.* 2 : 205-213.

Kabra P.M., Stevens G.L., Marton L.J. (1978) High-pressure liquid chromatographic analysis of diazepam, oxazepam and N-desmethyldiazepam in human blood. *J. Chromatogr.* 150 : 355-360.

Kang I., Miller L.G. (1991) Decreased GABA_A receptor subunit mRNA concentrations following chronic lorazepam administration. *Br. J. Pharmacol.* 103 : 1285-1287.

Kanto J.H. (1982) Use of benzodiazepines during pregnancy, labour and lactation, with particular reference to pharmacokinetic consideration, *Drugs* 23 : 354-380.

Kataoka Y., Shibata K., Gomita Y., Ueki S (1982) The mammillary body is a potential site of antianxiety action of benzodiazepines. *Brain Res.* 24 : 374-377.

Kataoka Y., Shibata K., Yamashita K., Ueki S (1987) Differential mechanisms involved in the anticonflict action of benzodiazepines injected into the central amygdala and mammillary body. *Brain Res.* 416 : 243-247.

Kelley A.E., Stinus L. (1984) Neuroanatomical and neurochemical substrates of affective behavior. In : *The psychobiology of affective behavior*. Fox N.A., Davidson R.J., Hillsdale N.J., eds, Lawrence Erlbaum Assoc., pp. 1-75.

Kellogg C., Ison J.R., Miller R.K. (1983) Prenatal diazepam exposure : effects on auditory temporal resolution in rats. *Psychopharmacology* 79 : 332-337.

Kellogg C., Tervo D., Ison J., Parisi T., Miller R.K. (1980) Prenatal exposure to diazepam alters behavioral development in rats. *Science* 207 : 205-207.

Kellogg C.K. (1988) Benzodiazepines : influence on the developing brain. *Prog. Brain Res.* 73 : 207-228.

Kellogg C.K., Chisholm J., Simmons R.D., Ison J.R., Miller R.K. (1983) Neural and behavioral consequences of prenatal exposure to diazepam. *Monogr. Neural Sci.* 9 : 119-129.

Kellogg C.K., Retell T.M. (1986) Release of [³H]norepinephrine : alteration by early developmental exposure to diazepam. *Brain Res.* 366 : 137-144.

Kellogg C.K., Sullivan A.T., Bitran D., Ison J.R. (1991) Modulation of noise-potentiated acoustic startle via the benzodiazepine- γ -aminobutyric acid receptor complex. *Behav. Neurosci.* 105 : 640-646.

Kelly P.A.T., Ford I., McCulloch J. (1986) The effect of diazepam upon local cerebral glucose use in the conscious rat. *Neuroscience* 19 : 257-265.

Kety S.S. (1957) The general metabolism of the brain in vivo. In : *Metabolism of the Nervous system*. Richter D., ed., Pergamon Press, London, pp. 221-237.

Kilfoil T., Michel A., Montgomery D., Whiting R.L. (1989) Effects of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety of mice. *Neuropharmacology* 28 : 901-905.

Kimble D.P. (1976) Changes in behavior of hippocampal-lesioned rat across a 6-week postoperative period. *Physiol. Psychol.* 4 : 289-293.

Klee C.B., Sokoloff L. (1967) Changes in D(-)- β -hydroxybutyric dehydrogenase activity during brain maturation in the rat. *J. Biol. Chem.* 242 : 3880-3883.

Knorr A., Deutch A.Y., Roth R.H. (1987) FG 7142, an anxiogenic β -carboline, selectively increases tyrosine hydroxylase in the medial prefrontal cortex. *Soc. Neurosci. Abstr.* 13 : 482.

Kolb B., Sutherland R.J., Whishaw I.Q. (1983) A comparison of the contributions of the frontal and parietal association cortex to spatial localization in rats. *Behav. Neurosci.* 97 : 13-27.

Kostowski W., Plaznik A., Stefanski R. (1989) Intra-hippocampal buspirone in animal models of anxiety. *Eur. J. Pharmacol.* 168 : 393-396.

Kraemer P.J., Gilbert M.E., Innis N.K. (1983) The influence of cue type and configuration upon radial-arm maze performance in the rat. *Anim. Learn. Behav.* 11 : 373-380.

Kraus H., Schlenker S., Schwedesky D. (1974) Developmental changes of cerebral ketone body utilisation in human infants. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 355 : 164-170.

Krebs H.A, Williamson D.H., Bates M.W., Page M.A., Hawkins R.A. (1971) The role of ketone bodies in caloric homeostasis. *Adv. Enzyme Regul.* 9 : 387-409.

Kulkarni S.K., Sharma A.C. (1991) Elevated plus-maze : a novel psychobehavioral tool to measure anxiety in rodents. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 13 : 573-577.

Kurishingal H., Palanza P., Brain P.F. (1992) Effects of exposure of pregnant mice to chlordiazepoxide (CDP) on the development and ultrasound production of their offspring. *Gen. Pharmac.* 23 : 49-53.

Kuschinsky W. (1982) Coupling between functional activity, metabolism and blood flow in the brain : state of the art. *Microcirculation* 2 : 357-378.

Laegreid L. (1990) Clinical observations in children after prenatal benzodiazepine exposure. *Dev. Pharmacol. Ther.* 15 : 186-188.

Laegreid L., Hagberg G., Lundberg A. (1992a) The effects of benzodiazepines on the fetus and the newborn. *Neuropediatrics* 23 : 18-23.

Laegreid L., Hagberg G., Lundberg A. (1992b) Neurodevelopment in late infancy after prenatal exposure to benzodiazepines - A prospective study. *Neuropediatrics* 23 : 60-67.

Laegreid L., Olegard R., Walström J., Conradi N. (1989) Teratogenic effects of benzodiazepine use during pregnancy. *J. Pediatr.* 114 : 126-131.

Lajtha A.L., Maker H.S., Clarke D.D. (1981) Metabolism and transport of carbohydrates and amino acids. In : *Basic Neurochemistry*, 3rd edition, Siegel G.J., Albers R.W., Agranoff B.W., Katzman R., eds., Little & Brown, Boston, pp. 445-469.

Lal H., Kumar B., Forster M.J. (1988) Enhancement of learning and memory in mice by a benzodiazepine antagonist. *FASEB Journal* 2 : 2707-2711.

Lalonde R., Botez M.I. (1990) The cerebellum and learning processes in animals. *Brain Res. Rev.* 15 : 325-332.

Lasbennes F., Seylaz J. (1986) Local cerebral blood flow in gently restrained rats : effects of propranolol and diazepam. *Exp. Brain Res.* 63 : 169-172.

Laurie D.J., Pratt J.A. (1989) Local cerebral glucose utilization following subacute and chronic diazepam pretreatment : differential tolerance. *Brain Res.* 504 : 101-111.

Laviola G., Pick C.G., Yanai J., Alleva E. (1992) Eight-arm maze performance, neophobia and hippocampal cholinergic alterations after prenatal oxazepam in mice. *Brain Res. Bull.* 29 : 609-616.

LeDoux J.E. (1992) Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Curr. Op. Neurobiol.* 2 : 191-197.

Legrand J. (1982) Hormones thyroïdiennes et maturation du système nerveux. *J. Physiol. (Paris)* 78 : 603-652.

Leong S.F., Clark J.B. (1984a) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes associated with glucose utilization. *Biochem. J.* 218 : 131-138.

Leong S.F., Clark J.B. (1984b) Regional enzyme development in rat brain. Enzymes of energy metabolism. *Biochem. J.* 218 : 139-145.

Levy M., Spino M. (1993) Neonatal withdrawal syndrome: associated drugs and pharmacologic management. *Pharmacotherapy* 13 : 202-211.

Lindvall O., Björklund A. (1974) The organization of the ascending catecholamine neuron systems in the rat brain, as revealed by the ptyoxylic acid fluorescence method. *Acta Physiol. Scand.* 412 : 1-48.

Lippa A.S., Beer B., Sano M.C., Vogel R.A., Meyerson L.R. (1981) Differential ontogeny of type I and II benzodiazepine receptors. *Life Sci.* 28 : 2343-2347.

Lista A., Blier P., De Montigny C. (1990) Benzodiazepine receptors modulating serotonergic neurotransmission in rat hippocampus do not desensitize after long-term diazepam treatment. *Brain Res.* 526 : 161-164.

Lister R.G. (1985) The amnesic action of benzodiazepines in man. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 8 : 87-94.

Lister R.G. (1987) The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 92 : 180-185.

Lister R.G., File S.E., Greenblatt D.J. (1983) Functional tolerance to lorazepam in the rat. *Psychopharmacology* 81 : 292-298.

Livezey G.T., Marczyński T.J., Isaac L. (1986a) Enduring effects of prenatal diazepam on the behavior, EEG and brain receptors of the adult cat progeny. *Neurotoxicol.* 7 : 319-333.

Livezey G.T., Marczyński T.J., Isaac L. (1986b) Prenatal diazepam : chronic anxiety and deficits in brain receptors in mature rat progeny. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 : 425-432.

Lopez-Cardoso M., Klein W. (1984) Ketone-body utilization and lipid synthesis by developing rat brain. A comparison between *in vivo* and *in vitro* experiments. *Neurochem. Int.* 6 : 459-466.

Löscher W., Nolting B., Fassbender C.P. (1990) The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. I. The influence of administration vehicle. *Epilepsy Res.* 7 : 173-181.

Magni S., Krekule I., Bures J. (1979) Radial maze type as a determinant of the choice behavior of rats. *J. Neurosci. Methods* 1 : 343-352.

Maguire C., Regan C.M. (1991) *In vitro* screening for anticonvulsant-induced teratogenesis : drug alteration of cell adhesivity. *Int. J. Devl. Neurosci.* 9 : 581-586.

Maitre J.F. (1991) Revue des différents tests comportementaux disponible pour le criblage des anxiolytiques. Mise au point au laboratoire du labyrinthe en croix surélevée. *Thèse de Doctorat de Pharmacie.* Université de Nancy I.

Mallorga P., Hamburg M., Tallman J.F., Gallager D.W. (1980) Ontogenetic changes in GABA modulation of brain benzodiazepine binding. *Neuropharmacology* 19 : 405-408.

Marcucci F., Guaitani A., Kvetina J., Mussini E., Garattini S. (1968) Species difference in diazepam metabolism and anticonvulsant effect. *Eur. J. Pharmacol.* 4 : 467-470.

Marczyński T.J., Hawkins P.G., Swann A.F., Krivograd M.K., Patel S., Dugich M. (1988) Perinatal upregulation of benzodiazepine receptor ontogenesis : "fearless" and more efficient goal-directed behavior of adult rat progenies. *Neurotoxicol. Teratol.* 10 : 101-111.

Marietta C.A., Eckardt M.J., Zbicz K.L., Weight F.F. (1990) Cerebral glucose utilization during diazepam withdrawal in rats. *Brain Res.* 511 : 192-196.

Marley R.J., Gallager D.W. (1989) Chronic diazepam treatment produces regionally specific changes in GABA-stimulated chloride influx. *Eur. J. Pharmacol.* 159 : 217-223.

Massotti M., Alleva F.R., Balazs T., Guidotti A. (1980) GABA and benzodiazepine receptors in the offspring of dams receiving diazepam : ontogenetic studies. *Neuropharmacology* 19 : 951-956.

Math F., Desor D., Krafft B. (1974) Ontogenèse de l'E.E.G. chez le rat en semi-liberté. Réponses à des stimulations olfactives, auditives et visuelles. *Rev. Comp. Animal* 8 : 312-319.

Mathew R.J., Wilson W.H. (1991) Evaluation of the effects of diazepam and an experimental anti-anxiety drug on regional cerebral blood flow. *Psychiatry Research : Neuroimaging* 40 : 125-134.

Mathew R.J., Wilson W.H. (1991) Substance abuse and cerebral blood flow. *Am J. Psychiatry* 148 : 292-305.

Mathew R.J., Wilson W.H., Humphreys D.F., Lowe J.V., Wiethe K.E. (1992) Changes in cerebral blood velocity after intravenous diazepam. *Biol. Psychiatry* 31 : 690-697.

Matsumoto R.R. (1989) GABA receptors : are cellular differences reflected in function ? *Brain Res. Rev.* 14 : 203-225.

Mazmanian D.S., Roberts W.A. (1983) Spatial memory in rats under restricted viewing conditions. *Learn. Motiv.* 14 : 123-139.

McIlwain H. (1971) Types of metabolic adaptation in the brain. *Essays in Biochemistry* 7 : 127-158.

McIlwain H., Bachelard H.S. (1985) *Biochemistry and the central nervous system*, 5th edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, pp. 154-201.

McNamara R.K., Skelton R.W. (1991) Diazepam impairs acquisition but not performance in the Morris water Maze. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 38 : 651-658.

Meberg A., Langslet A., Bredesen J.E., Lunde P.K.M. (1978) Plasma concentration of diazepam and N-desmethyldiazepam in children after a single rectal or intramuscular dose of diazepam. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14 : 273-276.

Meinecke D.L., Tallman J., Rakic P.J. (1989) GABA_A/benzodiazepine receptor-like immunoreactivity in rat and monkey cerebellum. *Brain Res.* 493 : 303-319.

Messer W.S. Jr., Stibbe J.R., Bohnett M. (1991) Involvement of the septohippocampal cholinergic system in representational memory. *Brain Res.* 564 : 66-72.

Meunier M., Jaffard R., Destrade C. (1991) Differential involvement of anterior and posterior cingulate cortices in spatial discriminative learning in a T-maze in mice. *Behav. Brain Res.* 44 : 133-143.

Middleton B. (1973) The acetoacetyl - Co A thiolases of rat brain and their relative activities during postnatal development. *Biochem. J.* 132 : 731-137.

Miller G., Greenblatt D.J., Barnhill J.G., Summer W.R., Shader R.I. (1988) "GABA shift" in vivo : enhancement of benzodiazepine binding in vivo by modulation of endogenous GABA. *Eur. J. Pharmacol.* 148 : 123-130.

Miller N.S., Gold M.S. (1990) Benzodiazepines : tolerance, dependence, abuse and addiction. *J. Psychoactive Drugs* 22 : 23-33.

Miranda R., Ceckler T., Guillet R., Kellogg C. (1990) Early developmental exposure to diazepam ligands alters brain ³¹P-NMR spectra in young adult rats. *Brain Res.* 506 : 85-92.

Miskin M., Appenzeller T. (1987) L'anatomie de la mémoire. *Pour la Science* 118 : 26-36.

Misslin R., Belzung C., Vogel E. (1990) Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav. Proc.* 18 : 119-132.

Möhler H., Okada T. (1977) Benzodiazepine receptor : demonstration in the central nervous system. *Science* 198 : 849-851.

Molinengo L., Orsetti M. (1976) Drug action on the grasping reflex and on swimming endurance : an attempt to characterize experimentally antidepressant drugs. *Neuropharmacology* 15 : 257-260.

Montgomery K.C. (1952) A test of two explanations of spontaneous alternation. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 45 : 287-293.

Montgomery K.C. (1958) The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 48 : 254-260.

Moore R.Y., Bloom F.E. (1978) Central catecholamine neuron systems : anatomy and physiology of the dopamine systems. *Ann. Rev. Neurosci.* 1 : 129-169.

Morgane P.J., Austin-Lafrance R.J., Bronzino J.D., Tonkiss J., Galler J.R. (1992) Malnutrition and the developing central nervous system. In : *The vulnerable brain and environmental risks, volume 1 : Malnutrition and hazard assessment*, Isaacson R.L., Jensen K.F., eds., Plenum Press, New York, pp. 3-44.

Mori K., Cruz N., Dienel G., Nelson T., Sokoloff L. (1989) Direct chemical measurement of the λ of the lumped constant of the (¹⁴C)deoxyglucose method in rat brain : effects of arterial plasma glucose level on the distribution spaces of (¹⁴C)deoxyglucose and glucose on I. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9 : 304-314.

Mori K., Schmidt K., Jay T., Palombo E., Nelson T., Lucignani G., Petitgrew K., Kennedy C., Sokoloff L. (1990) Optimal duration of experimental period in measurement of local cerebral glucose utilization with the deoxyglucose method. *J. Neurochem.* 54 : 307-319.

Morrow A.L., Paul S.M. (1988) Benzodiazepine enhancement of GABA mediated chloride ion flux in rat brain synaptoneurosomes. *J. Neurochem.* 50 : 302-306.

Mugnaini E., Oertel W.H. (1985) An atlas of the distribution of GABAergic neurons and terminals in the rat CNS as revealed by GAD immunohistochemistry. In : *Handbook of Chemical Neuroanatomy, vol. 4 (part 1)*, Bjorklund A., Hokfelt T., eds, Elsevier, Amsterdam, pp. 436-595.

Myslivecek J., Hassmannova J., Josifko M. (1991) Impact of prenatal low-dose diazepam or chlorpromazine on reflex and motor development and inhibitory-learning. *Homeostasis* 33 : 77-87.

Nagy J., Zambo K., Desci L. (1979) Anti-anxiety action of diazepam after intraamygdaloid application in the rat. *Neuropharmacology* 18 : 573-576.

Nakamura T., Ono H., Fukuda H., Tanabe M., Kozuka M., Iwata N. (1993) Local cerebral glucose utilization in rats with decerebrate rigidity and effects of centrally acting muscle relaxants, diazepam and tinazidine. *Biol. Pharm. Bull.* 16 : 33-35.

Narayan C.H., Fox M.W., Hamburger V. (1971) Prenatal development of spontaneous and evoked activity in the rat (*Rattus norvegicus albinus*). *Behaviour* 40 : 100-134.

Nehlig A., Daval J.L., Pereira de Vasconcelos A., Boyet S. (1991) Maturation postnatale des taux régionaux de synthèse protéique cérébrale chez le rat. *Circ. Métab. Cerv.* 8 : 176-196.

Nehlig A., Daval J.L., Pereira de Vasconcelos A., Boyet S. (1987) Caffeine-diazepam interaction and local cerebral glucose utilization in the conscious rat. *Brain Res.* 419 : 272-278.

Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A. (1993) Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Prog. Neurobiol.* 40 : 163-221.

Nehlig A., Pereira de Vasconcelos A., Boyet S. (1988) Quantitative autoradiographic measurement of local cerebral glucose utilization in freely moving rats during postnatal development. *J. Neurosci.* 8 : 2321-2333.

Nicholls B., Springham A., Mellanby J. (1992) The playground maze : a new method for measuring directed exploration in the rat. *J. Neurosci. Methods* 43 : 171-180.

Niehoff D.L., Kuhar M.J. (1983) Benzodiazepine receptors : localization in rat amygdala. *J. Neurosci.* 3 : 2091-2097.

Nilsson L., Siesjö B.K. (1974) Influence of anaesthetics on the balance between production and utilization of energy in the brain. *J. Neurochem.* 23 : 29-36.

Norton W.T., Poduslo S.E. (1973) Myelination in rat brain : changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.* 21 : 759-773.

O'Keefe J., Nadel L. (1978) *The hippocampus as a cognitive map*. Clarendon Press, Oxford.

O'Keefe J., Speakman A. (1987) Single unit activity in the rat hippocampus during spatial memory task. *Exp. Brain Res.* 68 : 1-27.

Olsen R., Yang J., King R.G., Dilber A., Stauber G.B., Ransom R.W. (1986) Barbiturate and benzodiazepine modulation of GABA receptor binding and function. *Life Sci.* 39 : 1969-1976.

Olson L., Seiger A., Fuxe K. (1972) Heterogeneity of striatal and limbic dopamine innervation : highly fluorescent islands in developing and adult rats. *Brain Res.* 44 : 283-288.

Olton D., Samuelson R.J. (1976) Remembrance of places passed : spatial memory in Rats. *J. Exp. Psychol. Anim. Behav. Proc.* 2 : 97-116.

Olton D.S., Becker J.T., Handelmann G.E. (1979) Hippocampus, space and memory. *Behav. Brain Sci.* 2 : 313-365.

Onaivi E.S., Martin B.R. (1989) Neuropharmacological and physiological validation of a computer-controlled two-compartment black and white box for the assessment of anxiety. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat.* 13 : 963-976.

Organisation Mondiale de la Santé (1969) Série de rapports techniques n°407. Comité OMS d'Experts de la Pharmacodépendance, 16ème rapport, Genève.

Owen O.E., Morgan A.P., Kemp H.G., Sullivan J.M., Herrera M.G., Cahill G.F. (1967) Brain metabolism during fasting. *J. Clin. Invest.* 46 : 1589-1595.

Packard M.G., Hirsh R., White N.M. (1989) Differential effects of fornix and caudate nucleus lesions on two radial maze tasks : evidence for multiple memory systems. *J. Neurosci.* 9 : 1465-1472.

Palacios J.M., Wamsley J.K., Kuhar M.J. (1981) High affinity GABA receptors autoradiographic localization. *Brain Res.* 222 : 285-307.

Palfreyman M.G., Hout S., Lippert B., Schechter P.J. (1978) The effect of λ -acetylenic GABA, an enzyme-activated irreversible inhibitor of GABA-transaminase, on dopamine pathways of the extrapyramidal and limbic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 50 : 325-336.

Pankaj V., Brain P.F. (1991) Effects of prenatal exposure to benzodiazepine-related drugs on early development and adult social behaviour in swiss mice. I. agonists. *Gen. Pharmac.* 22 : 33-41.

Papadopoulos V. (1993) Peripheral-type benzodiazepine/ diazepam binding inhibitor receptor : biological role in steroidogenic cell function. *Endocrinol. Rev.* 14 : 222-240.

Papez J.W. (1937) A proposed mechanism of emotion. *Arch. Neurol. Psychiat.* 38 : 725-744.

Pardridge W.M., Crane P.D., Mietus L.J., Oldendorf W.H. (1982) Kinetics of regional blood-brain barrier transport and brain phosphorylation of glucose and 2-deoxyglucose in the barbiturate anesthetized rat. *J. Neurochem.* 38 : 560-568.

Patel A.J., Balazs R. (1970) Manifestation of metabolic compartmentation during the maturation of the rat brain. *J. Neurochem.* 17 : 955-971.

Patel A.J., Balazs R. (1975) Factors affecting the development of metabolic compartmentation in the brain. In : *Metabolic compartmentation and neurotransmission. Relation to brain structure and function*, Berl S., Clarke D.D., Schneider D., Eds., Plenum Press, New York, pp. 363-383.

Patel A.J., Michaelson I.A., Cremer J.E., Balazs R. (1974) The metabolism of [14 C]glucose by the brains of suckling rats intoxicated with inorganic lead. *J. Neurochem.* 22 : 581-590.

Patel M.S., Owen O.E. (1977) Development and regulation of lipid synthesis from ketone bodies by rat brain. *J. Neurochem.* 28 : 109-114.

Peignot P. (1989) Structurations temporelle et spatiale de certains types d'interrelation sociale chez le rat Wistar. DEA "Régulations physiologiques et comportementales". Université de Strasbourg I.

Pellow S. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety : are exploratory models of anxiety in rodents valid ? *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 8 : 557-565.

Pellow S., Chopin P., File S.E., Briley M. (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as measure of anxiety in the rat *J. Neurosc. Method.* 14 : 149-167.

Pellow S., File S.E. (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze : a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 : 525-529.

Pereira de Vasconcelos A., Boyet S., Nehlig A. (1990a) Consequences of an early chronic phenobarbital treatment on postnatal evolution of local cerebral glucose utilization in the rat. *Dev. Brain Res.* 53 : 168-178.

Pereira de Vasconcelos A., Colin C., Desor D., Divry M., Nehlig A. (1990b) Influence of early neonatal phenobarbital exposure on cerebral energy metabolism and behavior. *Exp. Neurol.* 108 : 176-187.

Pereira de Vasconcelos A., El Hamdi G., Vert P., Nehlig A. (1992) An experimental model of generalized seizures for the measurement of local cerebral glucose utilization in the immature rat. II. Mapping of brain metabolism using the quantitative [¹⁴C]2-deoxyglucose technique. *Dev. Brain Res.* 69 : 243-259.

Pereira de Vasconcelos A., Nehlig A. (1987) Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of glucose carbon into amino acids. *Dev. Brain Res.* 36 : 219-229.

Pereira de Vasconcelos A., Schroeder H., Nehlig A. (1987) Effects of early phenobarbital treatment on the maturation of energy metabolism in the developing rat brain. I. Incorporation of β -hydroxybutyrate into amino acids. *Dev. Brain Res.* 36 : 231-236.

Perruzzi G., Abbrachio M.P., Cagianò R., Coen E., Cuomo V., Galli C.L., Lombardelli G., Marinovich M., Cattabeni P. (1983) Enduring behavioural and biochemical effects of perinatal treatment with caffeine and chlordiazepoxide. In : *Application of Behavioral Pharmacology to Toxicology*. Zbinden G., Cuomo V., Racagni G., Weiss B., eds., Raven Press, New York, pp. 217-236.

Persson B., Settergren G., Dahlquist G. (1972) Cerebral arterio-venous difference of acetoacetate and β -hydroxybutyrate in children. *Acta Paediatr. Scand.* 61 : 273-278.

Pesold C., Treit D. (1992) Excitotoxic lesions of the septum produce anxiolytic effects in the elevated plus-maze and the shock-probe burying tests. *Physiol. Behav.* 52 : 37-47.

Pesold C., Treit D. (1994) The septum and amygdala differentially mediate the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Brain Res.* 638 : 295-301.

Petroff O.A.C., Yu R.K., Ogino T. (1986) High-resolution proton magnetic resonance analysis of human cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.* 47 : 1270-1276.

Pinsker H.M., French G.M. (1967) Indirect delayed reactions under various testing conditions in normal and midlateral frontal monkeys. *Neuropsychologia* 4 : 13-24.

Pittaluga A., Raiteri M. (1988) Clonidine enhances the release of endogenous γ -aminobutyric acid through α -2 and α -1 adrenoceptors differentially located in rat cerebral cortex subregions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245 : 682-686.

Pratt J.A., Laurie D.J., McCulloch J. (1988) The effects of FG 7142 upon local cerebral glucose utilization suggest overlap between limbic structures important in anxiety and convulsions. *Brain Res.* 475 : 218-231.

Pritchett D.B., Sontheimer H., Shivers B.D., Ymer S., Kettenmann H., Schofield P.R., Seeburg P.H. (1989) Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology. *Nature* 338 : 582-585.

Puia G., Vicini S., Seeburg P.H., Costa E. (1992) Different sites of action of neurosteroids and benzodiazepines on natural and recombinant GABA_A receptors. In : *GABAergic synaptic transmission. Molecular, pharmacological and clinical aspects*, Biggio G., Concas A., Costa E., Eds, Raven Press, New York, pp. 103-110.

Quera-Salva M.A., Orluc A., Goldenberg F., Guilleminault C. (1991) Insomnia and use of hypnotics : study of a french population. *Sleep* 14 : 386-391.

Randall L.O., Scheckel C.L., Banziger R.F. (1965) Pharmacology of the metabolites of chlordiazepoxide and diazepam. *Curr. Therap. Res.* 7 : 590-606.

Randle P.J., England P.J., Denton R.M. (1970) Control of the tricarboxylate cycle and its interaction with glycolysis during acetate utilization in rat heart. *Biochem. J.* 117 : 677-695.

Randle P.J., Newholme E.A., Garland P.B. (1964) Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate and of alloxan diabetes, starvation on the uptake and metabolic fate of glucose in rat heart and diaphragm muscles. *Biochem. J.* 93 : 652-665.

Roberts W.A. (1979) Spatial memory in the rat on the hierarchical maze. *Learn. Motiv.* 10 : 117-140.

Roberts W.W., Dember W.N., Broderick M. (1962) Alternation and exploration in rats with hippocampal lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 55 : 695-700.

Robinson A.M., Williamson D.H. (1980) Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol. Rev.* 60 : 143-187.

Robinson J.H., Wang S.C (1979) Unit activity of limbic system neurons : effects of morphine, diazepam and neuroleptic agents. *Brain Res.* 166 : 149-159.

Rodgers R.J., Lee C., Shepherd J.K. (1992) Effects of diazepam on behavioural and antinociceptive responses to the elevated plus-maze in male mice depend upon treatment regimen and prior maze experience. *Psychopharmacology* 106 : 102-110.

Rodier P.M. (1980) Chronology of neuron development : animal studies and their clinical implications. *Dev. Med. Child Neurol.* 22 : 525-545.

Romijn H.J., Hofman M.A., Gramsbegen A. (1991) At what age is the developing cerebral cortex of the rat comparable to that of the full-term human newborn baby? *Early Hum. Dev.* 26 : 61-68.

Rothe T., Bigl V. (1989) The ontogeny of benzodiazepine receptors in selected regions of the rat brain : effect of perinatal exposure to diazepam. *Neuropharmacology* 28 : 503-508.

Rovira C., Ben Ari Y. (1991) Benzodiazepines do not potentiate GABA responses in neonatal hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* 130 : 157-161.

Ruderman N.B., Ross P.S., Berger M., Goodman M.N. (1974) Regulation of glucose and ketone bodies metabolism in brain of anesthetized rats. *Biochem. J.* 138 : 1-10.

Ryan C.L., Pappas B.A. (1986) Intrauterine diazepam exposure : effects on physical and neurobehavioral development in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 8 : 279-286.

Sacks W. (1957) Cerebral metabolism of isotopic glucose in normal human subjects. *J. Appl. Physiol.* 10 : 37-44.

Saper C.B., Swanson L.W., Cowan W.M. (1976) The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 169 : 409-442.

Sawrz J.R., Oster-Granite M.L. (1978) Presence of radial glia in foetal mouse cerebellum. *J. Neurocytol.* 7 : 301-312.

Scheel-Kruger J., Cooks A.R., Honig W. (1977) Muscimol antagonizes the ergometrine-induced locomotor activity in nucleus accumbens. Evidence of GABA-dopaminergic interaction. *Eur. J. Pharmacol.* 42 : 311-313.

Schenk F., Contant B., Groberty M.C. (1990) Angle and directionality affect rat's organization of visit sequences and spatial learning in modular mazes. *Learn. Motiv.* 21 : 164-189.

Schlumpf M., Parmar R., Schreiber A., Ramseier H.R., Bütikofer E., Abriel H., Barth M., Rhyner T., Lichtensteinger W. (1992) Nervous and immune systems as targets for developmental effects of benzodiazepines. A review of recent studies. *Dev. Pharmacol. Ther.* 18 : 145 - 158.

Schmidt D. (1983) How to use benzodiazepines. In : *Antiepileptic drug therapy in pediatrics*. Morselli P.L., Pippenberg C.E., Penry J.K., eds, Raven Press, New York, pp. 271-280.

Schroeder H., Bômont L., Nehlig A. (1991) Influence of early chronic phenobarbital treatment on cerebral arteriovenous differences of glucose and ketone bodies in the developing rat. *Int. J. Devl. Neuroscience* 5 : 453-461.

Schroeder H., Collignon A., Uttscheid L., Pereira de Vasconcelos A., Nehlig A. (1994a) Effects of early chronic diazepam treatment on incorporation of glucose and β -hydroxybutyrate into cerebral amino acids : relation to undernutrition. *Int. J. Devl. Neurosci.* (sous presse).

Schroeder H., Nolte A., Boyet S., Koziel V., Nehlig A. (1994b) Short- and long-term effects of neonatal diazepam exposure on local cerebral glucose utilization in the rat. *Brain Res.* (en soumission).

Schuijer F., Orzi F., Suda S., Kennedy C., Sokoloff L. (1981) The lumped constant for the (¹⁴C)deoxyglucose method in hyperglycemic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1 (suppl 1) : S63.

Schuijer F., Orzi F., Suda S., Lucignani G., Kennedy C., Sokoloff L. (1990) Influence of plasma glucose concentration on lumped constant of the deoxyglucose method : effects of hyperglycemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10 : 765-763.

Schulman J.A. (1983) Chemical neuroanatomy of the cerebellar cortex. In : *Chemical neuroanatomy*, Emson P.C., ed., Raven Press, New York, pp. 209-228.

Schwegler H., Crusio W.E., Brust I. (1990) Hippocampal mossy fibers and radial-maze learning in the mouse : a correlation with spatial working memory but not with non-spatial reference memory. *Neuroscience* 34 : 293-298.

Shah A.K., Simons K.J., Briggs C.J. (1991) Physical, biochemical and bioavailability studies of parenteral diazepam formulations containing propylen glycol and polyethylene glycol 400. *Drug Devel. Indus. Pharm.* 17 : 1635-1654.

Shibata K., Kataoka Y., Gomita Y., Ueki S. (1982) Localization of the site of the anticonflict action of benzodiazepines in the amygdaloid nucleus of rats. *Brain Res.* 234 : 442-446.

Shibata K., Kataoka Y., Yamashita K., Ueki S. (1986) An important role of the central amygdaloid nucleus and mammillary body in the mediation of conflict behavior in rats. *Brain Res.* 372 : 159-162.

Shibuya T., Watanabe Y., Hill H.F., Salafsky B. (1986) Developmental alterations in maturing rats caused by chronic prenatal and postnatal diazepam treatments. *Japan. J. Pharmacol.* 40 : 21-29.

Shore C.O., Vorhees C.V., Bornschein R.L., Stemmer K. (1983) Behavioral consequences of prenatal diazepam exposure in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.* 5 : 565-570.

Simiand J., Keane P.E., Morre M. (1984) The staircase test in mice : a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. *Psychopharmacology* 84 : 48-53.

Simmons R.D., Kellogg C.K., Miller R.K. (1984a) Prenatal diazepam exposure in rats : long-lasting, receptor-mediated effects on hypothalamic norepinephrine-containing neurons. *Brain Res.* 293 : 73-83.

Simmons R.D., Miller R.K., Kellogg C.K. (1984b) Prenatal exposure to diazepam alters central and peripheral responses to stress in adult rat offspring. *Brain Res.* 307 : 39-46.

Smart J.L. (1991) Critical periods in brain development. In : *Childhood environment and adult disease*, CIBA Foundation Symposia, volume 156, Bock G.R., Whelan J., eds., J.Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp. 109-129.

Smart J.L., Dobbing J. (1971) Vulnerability of developing brain. II. Effects of early nutritional deprivation on reflex ontogeny and development of behaviour in the rat. *Brain Res.* 28 : 85-95.

Sokoloff L. (1981) Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1 : 7-36.

Sokoloff L. (1982) The radioactive deoxyglucose method : theory, procedure and applications for the measurement of local glucose utilization in the central nervous system. In : *Advances in Neurochemistry (4)*. Agranoff B.W., Aprison M.H., eds, Plenum Publishing Corporation, pp. 3-82.

Sokoloff L. (1986) Cerebral circulation, energy metabolism and protein synthesis : general characteristics and principles of measurement. In : *Positron Emission Tomography and Autoradiography : principles and applications for the brain and the heart*. Phelps M., Maziotta J., Schebert H., eds., Raven Press, New York, pp. 1-71.

Sokoloff L., Fitzgerald G.G., Kaufman E.E. (1977a) Cerebral nutrition and energy metabolism. In : *Nutrition and the Brain*. Wurtman R.J., Wurtman J.J., eds., Raven Press, New York, vol. 1, pp. 87-139.

Sokoloff L., Reivich C., Kennedy C., Des Rosiers M.H., Patlak C.S., Petitgrew K.D., Sakurada O., Shinohara M. (1977b) The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization : theory, procedure and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J. Neurochem.* 28 : 897-916.

Spear L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.* 12 : 489-495.

Squires B., Bastrup C. (1977) Benzodiazepine receptors in rat brain. *Nature* 266 : 732-734.

Strang R.H.C., Bachelard H.S. (1973) Rates of cerebral glucose utilization in rats anesthetized with phenobarbitone. *J. Neurochem.* 19 : 2169-2173.

Stryer L. (1988) *Biochemistry*. 3rd edition, Freeman, New York.

Suda S., Shinohara M., Miyaoka M., Kennedy C., Sokoloff L. (1981) Local cerebral glucose utilization in hypoglycemia. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1 (suppl 1) : S62.

Suda S., Shinohara M., Miyaoka M., Lucignani G., Kennedy C., Sokoloff L. (1990) The lumped constant of the deoxyglucose method in hypoglycemia : effects of moderate hypoglycemia on local cerebral glucose utilization in the rat. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 10 : 499-509.

Suzuki S., Augerinos G., Black A.H. (1980) Stimulus control of spatial behavior on the eight-arm maze in rats. *Learn. Motiv.* 11 : 1-18.

Swiatek K.R., Dombrowski J.G., Jr., Chao K.L. (1984) The metabolism of D- and L-3-hydroxybutyrate in developing rat brain. *Biochem. Med.* 31 : 332-346.

Tam S.Y., Deutch A.Y., Yang J.X., Bannon M.J., Roth R.H. (1985) Anxiogenic β -carboline selectively increases monoamine metabolism in the prefrontal cortex and hypothalamus. *Soc. Neurosci. Abstr.* 11 : 1206.

Tam S.Y., Roth R.H. (1985) Selective increase in dopamine metabolism in the prefrontal cortex by the anxiogenic β -carboline FG 7142. *Biochem. Pharmacol.* 34 : 1595-1598.

Tappaz M.L., Brownstein M.J., Kopin I.J. (1977) Glutamate decarboxylase (GAD) and γ -aminobutyric acid (GABA) in discrete nuclei of hypothalamus and substantia nigra. *Brain Res.* 125 : 109-121.

Thiebot M.H., Hamon M., Soubrie P. (1982) Attenuation of induced-anxiety in rats by chlordiazepoxide : role of raphe dorsalis benzodiazepine binding sites and serotonergic neurons. *Neuroscience* 7 : 2287-2294.

Thomas G.J., Gash D.M. (1986) Differential effects of posterior septal lesions on dispositional and representational memory. *Behav. Neurosci.* 100 : 712-719.

Thomas J.B. (1972) Stimulus perseveration and choice behavior in rats with septal lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 80 : 97-105.

Thompson R.F. (1992) Memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2 : 203-208.

Tomaz C., Dickinson-Anson H., McGaugh J.L. (1991) Amygdala lesions block the amnesic effects of diazepam. *Brain Res.* 568 : 85-91.

Tomaz C., Dickinson-Anson H., McGaugh J.L., Souza-Silva M.A., Viana M.B., Graeff F.G. (1993) Localization in the amygdala of the amnesic action of diazepam on emotional memory. *Behav. Brain Res.* 58 : 99-105.

Toniolo-Kulnicz A.M. (1994) Variabilité inter-individuelle, contrainte de l'environnement et structuration de groupe : une étude chez le rat Wistar. *Thèse d'Université.* Université de Nancy II.

Tonon M.C., Smih-Rouet F., Lamacz M., Louiset E., Pelletier G., Vaudry H. (1994) Les endozépines, ligands endogènes des récepteurs aux benzodiazépines. *Médecine/Sciences* 10 : 433-443.

Treit D., Peslold C. (1990) Septal lesions inhibit fear reactions in two animal models of anxiolytic drug action. *Physiol. Behav.* 47 : 365-371.

Tucker J.C. (1985) Benzodiazepines and the developing rat : a critical review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 9 : 101-111.

Unnerstall J.R., Kuhar M.J., Niehoff D.L., Palacios J.M. (1981) Benzodiazepine receptors are coupled to a subpopulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors : evidence from a quantitative autoradiographic study. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218 : 797-804.

Van Wallegem E. (1993) Influence d'un retard de croissance intra-utérin sur le développement neurocomportemental du rat. *D.E.A. de Pharmacologie "Métabolisme et mécanisme d'action des médicaments - Pharmacologie clinique"* Université de Nancy I.

Vellucci S.V., File S.E. (1979) Chlordiazepoxide loses its anxiolytic action with long-term treatment. *Psychopharmacology* 62 : 61-65.

Vert P., Stern L. (1985) *Médecine Néonatale*. Masson, Paris

Volpe J.J. (1987) Teratogenic effects of drugs and passive addiction. In : *Neurology of the newborn*, 2nd edition, Volpe J.J., ed., Saunders Company, Philadelphia, pp. 664-697.

Vrba R., Gaitonde M.K., Richter D. (1962) The conversion of glucose carbon into protein in the brain and other organs of the rat. *J. Neurochem.* 9 : 465-475.

Vree T.B., Baars A.M., Hekster Y.A., Van der Kleijn E. (1979) Simultaneous determination of diazepam and its metabolites N-desmethyldiazepam, oxydiazepam and oxazepam in plasma and urine of man and dog by means of high-pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 162 : 605-615.

Wang L., Huang Z. (1990) Effects of clonazepam on brain development of mice. *Dev. Pharmacol. Ther.* 15 : 21-25.

Westerga J., Gramsbergen A. (1990) The development of locomotion in the rat. *Dev. Brain Res.* 57 : 163-174.

Wiggins R.C. (1982) Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res. Rev.* 4 : 151-175.

Wiggins R.C. (1986) Myelination : a critical stage in development. *Neurotoxicology* 7 : 103-120.

Willner P., Birbeck K. (1986) Effects of chlordiazepoxide and sodium valproate in two tests of spatial behavior. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 25 : 747-751.

Winick M., Noble A. (1966) Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J. Nutr.* 89 : 300-306.

Yadin E., Thomas E. (1991) The lateral septum as an anxiety-inhibiting structure : a new model for anxiolytic action. In : *The Pierre Fabre Monograph Series, vol. 4*, Briley M., File S.E., eds; MacMillan Press, New York.

Yadin E., Thomas E., Strickland C.E., Grishkat H.L. (1991) Anxiolytic effects of benzodiazepines in amygdala-lesioned rats. *Psychopharmacology* 103 : 473-479.

Yanai J., Bergman A. (1981) Neuronal deficits in mice after neonatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* 73 : 199-208.

Yanai J., Rosselli-Austin L., Tabakoff B. (1979) Neuronal deficits in mice following prenatal exposure to phenobarbital. *Exp. Neurol.* 64 : 237-244.

Yeh Y.Y., Sheenan P.M. (1985) Preferential use of ketone bodies in the brain and lung of newborn rats. *Fed. Proc.* 44 : 2352-2358.

Yeh Y.Y., Streuli V.L., Zee P. (1977) Ketone bodies serve as important precursors of brain lipids in the developing rat. *Lipids* 12 : 957-964.

Yoong Y.L., Lee H.S., Gwee M.C.E., Wong P.T.H. (1986) Acute tolerance to diazepam in mice : pharmacokinetic considerations. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 13 : 153-158.

Yoshino Y., Elliott K.A.C. (1970) Incorporation of carbon atoms from glucose into free amino acids in brain under normal and altered conditions. *Can. J. Biochem.* 48 : 228-235.

Young B.J., Helmstetter F.J., Rabchenuk S.A., Leaton R.N. (1991) Effect of systemic and intra-amygdaloid diazepam on long-term habituation of acoustic startle in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 39 : 903-909.

Young R., Johnson D.N. (1991) A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 40 : 739-743.

Young R.L., Albano R.F., Charnecki A.M., Demcsak G. (1969) Effect of diazepam on regional levels of glucose and malate in the central nervous system. *Fed. Proc.* 28 : 444.

Young W.S., Kuhar M.J. (1979) Autoradiographic localisation of benzodiazepine receptors in the brains of human and animals. *Nature* 280 : 393-395.

Young W.S., Kuhar M.J. (1980) Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212 : 337-346.

Yu O., Chiu T.H., Rosenberg H.C. (1988) Modulation of GABA-gated chloride ion flux in rat brain by acute and chronic benzodiazepine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246 : 107-113.

Zimmerberg B., Mickus L.A. (1990) Sex differences in corpus callosum : influence of prenatal alcohol exposure and maternal undernutrition. *Brain Res.* 537 : 115-122.





Nom, prénom : S C H R O E D E R Henri

Nature de la thèse : Doctorat de l'Université de Nancy 1
en Pharmacologie

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le **28 JUIN 1994** n°239

Le Président de l'Université de Nancy 1

Jean Pierre FINANCE

RESUME

Le diazépam (DZ) a été administré aux rats par voie sous-cutanée du 2ème au 21ème jour de vie postnatale à la dose de 10 mg/kg/jour. Les taux plasmatiques et cérébraux de DZ sont alors comparables à ceux obtenus chez l'homme lorsque cette drogue est utilisée à dose anticonvulsivante.

Aux différents stades du développement postnatal étudiés, le DZ induit un retard de croissance corporelle et cérébrale qui persiste à l'âge adulte ainsi qu'une hypoglycémie alors que les concentrations sanguines de β -hydroxybutyrate (β H β) et d'acétoacétate ne sont pas modifiées.

La biosynthèse des acides aminés cérébraux à partir du glucose-(2- 14 C) et du β H β -(3- 14 C) a été étudiée à 5, 10, 14 et 21 jours de vie postnatale. Le DZ induit une diminution significative de l'incorporation du carbone du glucose-(2- 14 C) dans les acides aminés uniquement à 5 et 10 jours sans qu'il y ait modification de la concentration tissulaire et de la répartition du marquage radioactif entre les différents acides aminés. A partir du β H β -(3- 14 C), seule la radioactivité de la glutamine est diminuée à 5 et 10 jours chez les rats traités au DZ.

L'utilisation cérébrale locale de glucose (UCLG) a été mesurée par autoradiographie quantitative au 2-désoxyglucose-(14 C) chez des animaux âgés de 10, 14, 21 et 60 jours. L'UCLG est significativement diminuée par l'administration de DZ dans, respectivement, 13, 48, 23 et 14 des 66 structures cérébrales étudiées. Ces baisses sont plus particulièrement localisées dans les aires auditives et visuelles, différentes structures corticales, limbiques et motrices, le thalamus et les corps mammillaires.

Des tests d'évaluation du développement neuromoteur ont été pratiqués entre 4 et 20 jours de vie postnatale ainsi que des tests d'exploration en labyrinthe au stade de 60 jours. Le comportement social a été également étudié en confrontant les animaux traités au DZ aux rats témoins au sein de groupes placés dans une situation de contrainte d'accès à la nourriture. Au cours du développement postnatal, le DZ induit des troubles de l'équilibre et de la motricité. A long terme, le comportement d'exploration ainsi que les capacités d'apprentissage et de mémorisation des rats exposés au DZ sont modifiés et semblent être modulés en fonction de la motivation exercée par le test utilisé. Par contre, le DZ ne confère pas de statut social particulier aux animaux qui y ont été exposés.

Les résultats de l'ensemble de cette étude indiquent que le métabolisme énergétique cérébral serait sensible à une exposition précoce au DZ uniquement aux stades les plus immatures, c'est à dire lors de la phase de croissance active du cerveau. A long terme, le DZ induit des troubles comportementaux de la mémoire et de l'anxiété qui peuvent être corrélés aux baisses de l'activité fonctionnelle cérébrale observées dans des structures particulièrement riches en récepteurs aux benzodiazépines. Les effets du DZ sur la croissance cérébrale semblent être directs et non liés à une sous-nutrition résultant de la sédation.

mots clés : anticonvulsivant, benzodiazépines, β -hydroxybutyrate, cerveau, chronique, comportement, développement, diazépam, glucose, métabolisme