



**FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**THESE**

En vue de l'obtention du diplôme de

**DOCTEUR ES SCIENCE**

En Biologie et Physiologie Animale

**Intitulé**

---

**Effets du stress prénatal au toluène sur le développement de  
la progéniture des rats Wistar: Aspect neuro-  
comportemental et physiologique**

---

**Présentée par : Mme LATRECHE Asma**

*Devant la commission d'examen :*

**Président :**

BOUZERNA Nouredine      Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

**Examineurs:**

FISSON Sylvain      Pr. Université d'Evry Val d'Essonne (UEVE). France

OUALI Kheireddine      Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

BOUDAH Abdennacer      MCA Université Mentouri - Constantine

BAAZIZ NACER      MCA Université Mentouri - Constantine

**Directeur de thèse:**

FRIH Hacène      MCA Université Badji Mokhtar - Annaba

## *Remerciements*

*Au nom de Dieu dont le nom ouvre tout parcours et sans lui rien ne sera accompli.  
Que Dieu bénisse notre travail*

Je tiens en premier lieu à remercier le Comité d'Examen de ma thèse,

Monsieur **FISSON Sylvain**, Professeur à l'université d'Evry Val d'Essonne (UEVE). France, Merci d'avoir accepté d'être le rapporteur de ce travail.

Monsieur **OUALI Kheireddine**, professeur à l'université Badji Mokhtar de Annaba, Merci aussi de vouloir examiner cette thèse.

Monsieur **BOUDAH Abdennacer**, Maitre de conférences de classe A à l'université Mentouri de Constantine, Merci pour le temps consacré à lire mon manuscrit.

Monsieur **BAAZIZ NACER**, Maitre de conférences de classe A à l'Université Mentouri de Constantine, Merci de bien vouloir examiner mon document.

C'est un honneur Messieurs pour moi que de pouvoir bénéficier de vos critiques.

Je remercie, monsieur le professeur **BOUZERNA Noureddine**, pour avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'à l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je remercie particulièrement Monsieur **Frih hacene**, Maitre de conférences de classe A, mon directeur de thèse. Merci pour m'avoir fait confiance. Merci aussi pour votre disponibilité. Votre dynamisme, votre motivation sans limites et votre passion pour les neurosciences resteront pour moi des exemples à suivre. Bravo pour ce que vous avez fait pour l'équipe et pour le laboratoire et pour tout le reste.

## *Remerciements*

Je tiens à remercier également Professeur TAHRAOUI Abdelkrim de m'avoir permis de travailler au sein de son laboratoire « Immuno-endocrinologie » et pour la confiance et le respect témoignés durant mon séjour.

Merci à **Dr Ali Rachedi** pour sa contribution à la rédaction de la thèse. Merci de m'avoir fourni la documentation essentielle.

Je remercie l'ensemble des doctorantes. C'est avec beaucoup de nostalgie que je continuerai de penser à vous. Je remercie tout particulièrement mes collègues :

**Mme Bensaoula Doria Amina, Mr. Chettoum Aziez, Mme Guedri Kamilia** et **Melle Taaya Hakima**, Merci pour cette tranche de vie.

Je souhaite remercier très amicalement le Professeur **Tahar ali** pour ses sages conseils, son soutien et surtout la confiance particulière dont il m'a témoignée.

*Que notre accomplissement nous portera gloire et fierté*

## *Dédicaces*

Je dédie mon travail à

Ma belle et petite famille : mon honorable marie et mes petits anges sans eux  
rien ne serai utile.

Egalement à mes très chers parents, sans leur dévouement et leurs soutiens je  
ne serai arrivée à cette étape du parcours

Merci maman pour tes encouragements et ta veille sur moi tout le temps,  
comme une ombrelle qui me protège des fortes pluies et du soleil ardent je te  
dois tout à vie

Papa que ton silence dit lent sur tes priorités, merci de m'avoir rafraichi avec  
tes idées pertinentes tout le temps où j'ai suffoqué

Je tiens aussi à faire un énorme salut à mes frères, qui me soutiennent et  
croient toujours en moi en toutes circonstances

Merci à vous

## LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre du tableau	Page
Tableau 1	Caractérisation des paramètres de la gestation chez le rat Wistar	14
Tableau 2	Effet du Clonazepam (agoniste GABAArgique) sur les paramètres de la nage forcée chez les rattes Wistar Témoins non gestantes et gestantes (Basale et TG) et traitées au toluène non gestantes et gestantes (Tol, TolG)	18
Tableau 3	Variation du poids relatif (g/100g de rat) des ovaires, cerveau et surrénales chez les rattes gestantes et non gestantes traitées au toluène.	19
Tableau 4	Sex ratio (%) des ratons	46
Tableau 5	Taille des portées issues de femelles traitées et contrôles	46
Tableau 6	Évolutions pondérales des petits ratons	47
Tableau 7	Age de sorties d'incisives des jeunes mâles	48
Tableau 8	Age de sortie d'incisives des jeunes femelles	48
Tableau 9	Age d'ouvertures des yeux des jeunes mâles	48
Tableau 10	Age d'ouverture des yeux des jeunes femelles	49
Tableau 11	Temps de latence de retournements des jeunes mâles	49
Tableau 12	Temps de latence de retournement des jeunes femelles	50
Tableau 13	Angle de chute des jeunes mâles	50
Tableau 14	Angle de chut des jeunes femelles	51
Tableau 15	Réaction antigravitaire des jeunes mâles	51

Tableau 16	Réaction antigravitaire des jeunes femelles	52
Tableau 17	Durée de suspension des jeunes mâles	52
Tableau 18	Durée de suspension des jeunes femelles	52
Tableau 19	Activité locomotrice, exploratrice et anxiété des jeunes mâles	53
Tableau 20	Activité locomotrice, exploratrice et anxiété des jeunes femelles	54
Tableau 21	Temps de latence pour se réfugier sur la plate forme des jeunes mâles	55
Tableau 22	Temps de latence pour se réfugier sur la plateforme des jeunes femelles	56
Tableau 23	Activité locomotrice, activité exploratrice et indice d'anxiété dans le test d'open Field dans la population rat mâle	57
Tableau 24	Activité locomotrice, activité exploratrice et indice d'anxiété dans le test d'open Field dans la population rat femelle	58
Tableau 25	Le niveau d'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée entre les mâles adultes.	59
Tableau 26	Le degré d'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée entre les femelles	60
Tableau 27	Le temps d'escalade, de nage et d'immobilité pendant le test de nage forcée parmi les femelles	61
Tableau 28	Le temps d'escalade, de nage et d'immobilité pendant le test de nage forcée parmi les mâles	62
Tableau 29	Paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours)	63
Tableau 30	Paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours)	64
Tableau 31	Paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours) après traitement à la dexaméthasone	65

Tableau 32	Paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours) après traitement à la dexaméthasone.	66
------------	---	----





## LISTE DES FIGURES

N°	Titre de la figure	Page
Figure 1	protocole expérimental chez les rattes mères (partie1)	13
Figure 2	Variation du taux de la LH plasmatique (mUI/ml) suite au traitement au toluène du 4ème au 14ème jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7ème jour, 14ème jour et après mise bas.	16
Figure 3	Variation du taux de la progestérone plasmatique (ng/ml) suite au traitement au toluène du 4ème au 14ème jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7ème jour, 14ème jour et après mise bas ;	17
Figure 4	Dispositifs de Nage forcée	35
Figure 5	Dispositif du labyrinthe en croix surélevée	37
Figure 6	Dispositif des champs ouvert	39
Figure 7	Dispositif du labyrinthe aquatique de Morris	41
Figure 8	Protocole expérimental chez les nouveaux nés (partie 2)	44
Figure 9	protocole expérimental chez les adultes (partie 3)	45

## Liste des Abréviations

<b>FST</b>	Forced Swimming Test
<b>5HT</b>	5-hydroxytryptamine
<b>DL 50</b>	Dose létale 50
<b>DEX</b>	Dexaméthasone
<b>GABA</b>	<b>Gamma-Aminobutyric Acid</b>
<b>NAS</b>	Neuro-Active Steroids
<b>IP</b>	Intra- péritonéale
<b>TG</b>	Temoin Gestante
<b>Tol</b>	Toluène
<b>ToIG</b>	Toluène Gestante
<b>LH</b>	Luteinizing Hormone (Hormone lutéinisante)
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked Immunosorbent assay ( dosage d'immunoabsorption par enzyme liée )
<b>ApMB</b>	Après mise bas
<b>NMDA</b>	D-aspartate n-méthylque
<b>DHEA</b>	Déhydroépiandrostérone
<b>PN</b>	Post Natal
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>EDTA</b>	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
<b>FNS</b>	Formule Numération Sanguine
<b>CMH</b>	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
<b>HHS</b>	Hypothalamo-hypophyso-surrénalien

## SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE .....	1
CHAPITRE 1: Etude des effets du toluène chez la rate gestante: Aspect neuro-comportemental et physiologique. ....	5
Résumé .....	5
Abstract.....	6
ملخص.....	7
1. Introduction .....	8
2. Matériels et Méthodes.....	10
2.1. Matériel biologique.....	10
2.1.1. Détermination de la réceptivité sexuelle .....	10
2.2 .Administration du toluène .....	11
2.3. Tests comportementaux .....	11
2.3.1. Test de la nage forcée .....	11
2.4 .Prélèvements .....	12
2.4.1. Prélèvements sanguins .....	12
2.4.2. Dissection et prélèvement des organes .....	12
2.5. Analyse statistique des résultats .....	12
3. Résultats.....	14
3.1. Caractérisation des paramètres de la gestation .....	14
3.2. Variation des paramètres hormonaux .....	15
3.2.1. Variation du taux de LH plasmatique (mUI/ml) .....	15
3.2.2 .Variation du taux de la progestérone plasmatique (ng/ml) .....	16
3.3. Variation des paramètres de la nage forcée .....	17
3.4. Variation du poids relatif des ovaires, surrénales et cerveau .....	18
4. Discussion .....	20

5. Conclusion .....	24
CHAPITRE 2 : Effets du stress prénatal au toluène sur le développement de la progéniture des rats Wistar : Aspect neuro-comportemental et physiologique .....	25
Résumé .....	25
Abstract.....	26
ملخص.....	27
1. introduction .....	28
2. Matériels et Méthodes.....	30
2.1 Matériel biologique.....	30
2.2 Effet sur le développement physique des nouveaux nés.....	30
2.3 Effet sur les paramètres Neuromoteurs des ratons .....	31
2.3.1. Test de retournement .....	31
2.3.2. Test d'agrippement .....	31
2.3.3. Test de réaction antigravitaire .....	31
2.3.4. Test de suspension .....	32
2.4. Effet sur le développement comportemental et cognitif des jeunes ....	32
2.4.1. Test des champs ouverts (PN45) .....	32
2.4.2. Test de Morris .....	32
2.5. Effet du traitement sur le développement cognitif et comportemental des ratons à l'âge adulte .....	33
2.5.1. Matériel biologiques.....	33
2.5.2. Méthodes .....	33
2.5.2.1. Test de freinage à la dexaméthasone.....	33
2.5.2.2. Prélèvement .....	33
2.5.3. Etude comportementale .....	34
2.5.3.1. Procédure de la nage forcée (Forced Swimming Test).....	34

a- Description du test .....	34
b- Variables mesurées .....	35
2.5.3.2. Procédure du labyrinthe en croix surélevée (Plus Maze Test) .....	36
a- Description du test .....	36
b- Dispositif utilisé .....	37
c- Variables mesurées .....	37
2.5.3.3. Procédure des champs ouverts (Open Field Test) .....	38
a. Description du test .....	38
b. Dispositif utilisé .....	39
c. Variables mesurées .....	40
2.5.3.4. Procédure de Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water Maze Test) .....	40
a. Dispositif expérimental.....	40
b. Protocole et variables mesurés.....	41
2.5.4. Dosage des paramètres immunitaires .....	42
2.5.4.1. Dosage des immunoglobulines.....	42
2.5.4.1.1. Principe de test .....	42
2.5.4.1.2. Prélèvement et préparation des échantillons .....	43
2.5.4.1.3. Réactifs -Composition et concentrations .....	43
2.5.4.1.4. Conservation et stabilité .....	43
2.5.4.1.5. Calcule de résultats .....	43
2.6 Analyses statistiques .....	43
3. Résultats .....	46
3.1 Effet du traitement sur la taille de la portée et sex-ratio à la naissance ..	46
3.1.1 Sex ratio des ratons.....	46
3.1.2 Taille des portées.....	46

3.2. Effets du traitement au toluène sur le développement physique des rats	47
3.2.1 Evolution pondérale (J2 J5 J9 J12 J15 et J18)	47
3.2.2 Age de percée d'incisive	47
3.2.3 Age d'ouverture des yeux	48
3.3. Effet du traitement au toluène sur le développement neuro-moteur des jeunes	49
3.3.1 Test de retournement	49
3.3.2. Test d'agrippement	50
3.3.3. Test de réaction antigravitaire	51
3.3.4. Test de suspension	52
3.4. Effet sur le développement comportemental et cognitif des jeunes	53
3.4.1. Test des champs ouverts	53
3.4.2. Test de Morris	55
3.5. Résultats des tests comportementaux chez les rats à l'âge adulte	56
3.5.1. Effets du stress prénatal au toluène sur le comportement des rats dans le Test des champs ouverts à l'âge adulte	56
3.5.2. Effets du stress prénatal au toluène sur le comportement des rats dans le Test du labyrinthe en croix surélevée à l'âge adulte	58
3.5.3. L'effet du stress prénatal au toluène sur les résultats de la nage forcée à l'âge adulte	60
3.6. Résultats des paramètres immunologiques chez les rats à l'âge adulte (70 jours)	63
3.6.1. Variations des populations leucocytaires et des immunoglobulines G chez les rats mâles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène	63

3.6.2. Variations des populations leucocytaires et des immunoglobulines G chez les rattes femelles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène .....	64
3.6.3. Variations des paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène après traitement à la dexaméthasone.....	65
3.6.4. Variations des paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours) issues des mères contrôles et traitées au toluène après traitement à la dexaméthasone.....	66
4. Discussion .....	68
5. Conclusion .....	73
CONCLUSION GENERALE .....	76
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE .....	78

## INTRODUCTION GENERALE

Le toluène est l'un des solvants organiques les plus couramment utilisés dans la vie quotidienne (**Kurtzman et al., 2001**). L'exposition d'un organisme vivant au toluène provoque souvent des réponses physiologiques variables qui peuvent avoir un impact sur les processus biologiques fondamentaux (reproduction, développement, ...). Par exemple, des stress gestationnels, chez le rat de laboratoire, liés à son administration, tendent à provoquer un déséquilibre de l'unité fœto-maternelle et installer, aussi bien chez la mère que chez le futur raton, des troubles anxieux, et une conduite de dépendance aux drogues (**Balster, 1998; Bukowski, 2001**). Les effets pharmacologiques et les réactions neurotoxiques liés à l'administration du toluène comprennent des effets sur le système nerveux central (SNC) : systèmes GABAergique, glutaminergiques, sérotoninergiques et dopaminergiques (**Balster, 1998; Filley et al., 2004; Fomazzari, 1990; Lopreato et al., 2003**).

L'inhalation est la voie typique d'exposition humaine au toluène, mais il peut être absorbé par la peau et le tractus gastro-intestinal. La limite d'exposition professionnelle pour le toluène est de 50 ppm au Japon (**Japan Society de travail Santé, 1994**), bien que la valeur limite d'exposition est mise à jour 20ppm aux États-Unis (**ACGIH, 2006**). Le toluène traverse facilement la barrière hémato-encéphalique après l'inhalation et produit des effets similaires à celle des sédatifs-hypnotiques tels que l'alcool et les benzodiazépines (**Balster, 1998**). Le toluène a une forte affinité pour les tissus riches en lipides et peut facilement traverser le placenta, ce qui permet une exposition directe du fœtus (**Scott et al., 2009**).

Les études sur les effets de l'exposition au toluène ont révélé que le toluène affecte principalement le système nerveux central, provoquant une tendance accrue à dormir, maux de tête fréquents, irritation oculaire (**Echeverria et al., 1991**) les étourdissements, la dépression et la fatigue chez les travailleurs de peinture (**Kishi et al., 1993; Wang et Chen, 1993**).

En outre, l'inhalation de faibles concentrations de toluène induit un déficit persistant dans l'espace l'apprentissage et la mémoire chez l'homme (**Chouanière**



**et al., 2002 ; Lee et al., 2003 ; Yu et al., 2004 )** et chez les animaux (**Von Euler et al., 1993 ; Von Euler et al., 2000**).

Il a été rapporté aussi que l'exposition abusée de la femme enceinte au toluène entraîne une embryopathie connue sous le nom de « solvant fœtale syndrome », dans lequel un retard de croissance et microencéphalie sont les principaux effets des nouveau-nés, accompagnés d'un visage typique apparition avec des yeux enfoncés, les oreilles implantées bas , un pont nasal plat , micrognathie et des déficits cognitif : un retard de développement , troubles du langage et de l'hyperactivité (**Hwei-Hsien et al., 2005; Tin-Tin et al., 2010**)

Alors que les effets neurocomportementaux et neurotoxiques du toluène ont été étudiés sensiblement, les mécanismes d'action de toluène dans le cerveau ne sont pas pleinement compris. **Cruz et al. (1998 )** ont suggéré que certains effets de toluène sur l'activité neuronale et le comportement pourraient être dus à l'inhibition du récepteur à NMDA. Un certain nombre d'études ont montré une interaction large spectre de toluène avec différents systèmes neuronaux, tels que glutamatergique, GABAergique, dopaminergique, sérotoninergique, et des systèmes cholinergiques (**Balster , 1998; Tin-Tin et al. 2007**)

L'accumulation des preuves suggère que l'exposition d'une femme enceinte à un stress physique et / ou psychologique appelé entre autre “ stress prenatal” ou PS pourrait affecter sa progéniture en provoquant des troubles du comportement et / ou de l'humeur plus tard dans la vie (**Henry et al., 1994**).

Dans les études animales PS a été associée avec une réduction du poids de naissance et augmentation de la mortalité avant sevrage , perturbations de l'axe hypothalamo -hypophyso-surrénalien, augmentation de l'anxiété, des altérations du sommeil paradoxal persistants , l'apprentissage et les déficits de mémoire , et l'augmentation de comportements dépressifs comme plus tard dans la vie (**Henry et al., 1994**).

Par ailleurs, il a été suggéré que des stress soutenus durant des phases critiques du développement (phase post natale, la prime enfance, l'adolescence) entraîneraient, à l'âge adulte, des dysfonctionnements neuroendocriniens et comportementaux (**Anisman et al., 1998 ; Pryce et al., 2005 ; Frih et al., 2009**). Des études récentes ont également démontré que le stress prénatal ressenti par

la mère aurait des répercussions sur la physiologie et le comportement de la progéniture à l'âge adulte.

Les effets du stress prénatal ont été surtout testés chez les animaux jeunes (**Coe et al., 1996**), mais le stress prénatal semble aussi affecter les organismes adultes. A ce titre, plusieurs études ont démontré que les rats, ayant vécu un stress prénatal, présentent à l'âge adulte une augmentation de l'émotivité et de l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée (**S Maccari et al., 1997; Welberg et al., 2001**). Cependant, cet effet n'était pas rapporté par d'autres auteurs (**Lordi et al., 2000 ; Tazumi et al., 2005**). En plus, les résultats sur le comportement au test des champs ouverts sont contradictoires (**Vallée et al., 1997 ; Poltyrev et al., 1996 ; Tazumi et al., 2005 ; Cannizzaro et al., 2006**).

En outre, concernant l'activité de l'axe corticotrope (hypothalamo-hypophyso-surrénalien), il a été prouvé que les animaux ayant subi un stress prénatal, présentent à l'âge adulte, en réaction au stress, une plus forte sécrétion de la corticostérone plasmatique par rapport aux animaux contrôles (**Weinstock., 1997 ; Barrot et al., 1999**). Cependant, la plupart des études n'ont pas trouvé de différences dans les concentrations de corticostérone plasmatique à l'état basal (**Sobrian et al., 1997 ; Barbazanges et al., 1996 ; Takahashi et Kalin., 1991; Kaiser et al., 2003**).

Par exemple , PS augmenté le stress induit par adrénocorticotrophine (ACTH ) et la corticostérone ( CORT ) la sécrétion et la diminution de la capacité de liaison des récepteurs glucocorticoïdes de l'hippocampe ( GRS ) (**Koehl et al ., 1999**). On suppose que le dysfonctionnement de l'axe hypothalamo -hypophyso- surrénalien est médié par les glucocorticoïdes maternelles pendant la gestation (**Lesage et al., 2004**).

Dans le cadre de notre travail, l'expérience a été menée au près des rat Wistar afin d'étudier l'effet de l'exposition prénatale au toluène sur la progéniture du rat Wistar à court et long terme.

Sur ce fait, des rattes Wistar gestantes ont reçu une dose de toluène relativement faible (1/6 de la DL50) par voie intra-péritonéale quotidiennement pendant une semaine (du 7<sup>ème</sup> jour de gestation jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour). dans cette approche des tests comportementaux (test : des champs ouverts, nage forcée, labyrinthe en

croix surélevée) ont été réalisés tout d'abord chez la femelles durant la période de gestation pour évaluer l'impact du stress au toluène sur le comportement de la femelle, associés à un dosage hormonal de FSH et LH et une étude histologique. Ensuite une batterie de tests post-natale a été effectuée au prés des petits nés (aussi bien les femelles que les mâles), de la naissance jusqu'à l'âge juvénile (adolescent) afin de nous permettre d'estimer l'impact du toluène administré sur la gestation des femelles et aussi sur le développement physique, cognitif et comportemental de la nouvelle génération. En fin pour voir le changement opéré de cette approche expérimentale sur les rattons à l'âge adulte une étude comportementale et endocrinologique a été accomplie.

Ce Modest manuscrit se présente en deux parties une qui étudie les effets du toluène sur les rattes gestante et une deuxième partie qui traitera les impacts du toluène sur la descendance.

## Chapitre 1:

### **Etude des effets du toluène chez la rate gestante: Aspect neuro-comportemental et physiologique.**

#### **Résumé**

Les conséquences neuro-comportementales et physiologiques, suite à l'administration sub chronique du toluène (Tol), ont été examinées chez le rat Wistar femelle gestante. Un quart de la concentration de la DL50 du Tol a été injecté en IP chez les rattes gestante du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation. Les prélèvements de sang et la mesure des taux sériques de progestérone et de LH (hormone lutéinisante) ont été réalisées au 7<sup>ème</sup> jour de gestation (3<sup>ème</sup> jour du traitement), au 14<sup>ème</sup> jour (dernier jour du traitement) et après la mise bas (10<sup>ème</sup> jour après l'arrêt du traitement). Après la mise bas qui coïncide avec le 21<sup>ème</sup> jour, nous avons testé l'efficacité d'un agoniste GABAergique, le Clonazepam au cours de la nage forcée (modélisation animal de la dépression). Après décapitation, le cerveau, les surrénales et les ovaires ont été pesés et nous avons calculé les poids relatifs de ces organes. Nos résultats montrent que l'application d'un stress chronique sous toluène a entraîné des perturbations du système endocrinien (taux plasmatiques de LH et de progestérone) et pondérale (poids relatif du cerveau, ovaires et surrénales) qui semblent être irréversibles chez les rattes non gestantes traitées au Tol. Par contre, le même traitement associé à la gestation révèle un effet de rétablissement dix jours après l'arrêt du traitement. L'inefficacité du traitement au Clonazepam enregistrée chez les animaux Tol s'avère efficace chez le lot TolG. La gestation semble jouer un effet modérateur sur la nocivité et la neurotoxicité du toluène, probablement par des neurostéroïdes.

**Mots clés:** *Gestation - Toluène - Progestérone - LH - Neurostéroïdes - Nage forcée*

## **Abstract**

The neuro behavior and physiological consequences, following the sub chronic administration of toluene (Tol), were examined in the pregnant Wistar rats. A quarter lethal dose concentration (LD50) of Tol was injected in ip at the pregnant rats from day 4 to day 14 of gestation. The blood samples and the measurement of the plasma levels of progesterone and luteinizing hormone (LH) were carried out at the 7th day of gestation (3rd day of the treatment), with the 14th day (last day of the treatment) and after delivery (10th day after discontinuation of therapy). After delivery, at the 21st day, the effectiveness of an agonist GABAergic (clonazepam) during the forced swimming test (modelling animal of the depression) was tested. After decapitation, the brain, the adrenals and the ovaries were weighed and the relative weight of these organs was calculated. Our results announced that the application of a sub chronic stress (10 days) by toluene caused endocrine disruption (plasma LH and progesterone) and weight (brain, ovaries and adrenal glands) that appear to be irreversible in non-pregnant animals treated with toluene. For cons, the same treatment associated with pregnancy reveals a healing effect ten days after stopping treatment. Inefficiency of the treatment with Clonazepam in the Tol animals (virgin treated with toluene), this treatment is effective in TolG group (Pregnant treated with Tol). Gestation appears to play a moderating effect on the harmfulness and the neurotoxicity of toluene, probably by neurosteroids.

**Key words:** *Pregnancy – Toluene – Progesterone – LH - Neurosteroids – Forced swimming test*

## ملخص

تم فحص عواقب تأثير مادة التولوين على الجهاز الغدي العصبي لقد تم حقن ربع جرعة ممينة لمادة التولوين للفأرات و فيزيولوجيا فئران ويستار

الحوامل خلال فترة الحمل الممتدة من اليوم 4 إلى يوم 14 من الحمل في الأيام 7 من الحمل (ثالث يوم من المعاملة بالتولوين), 14 (اليوم العاشر من المعاملة) و 21 (10 أيام بعد إيقاف المعاملة) . أجريت فحوصات دموية لغرض (هرمون يفرز بواسطة الغدة النخامية) . بعد الولادة , تم اختبار دواء LH قياس مستويات هرمون البروجسترون و خلال حصة اختبار السباحة الملزمة. أبدت النتائج على أن تطبيق إجهاد مزمن مخدر مضاد للاكتئاب كلونازيبام عند LH المدة 10 أيام بواسطة مادة التولوين يسبب تدهور في وزن الأعضاء و مستوى الهرمونات البروجسترون و الفأرات الغير حوامل. أما عند الفأرات الحوامل فتأثير التولوين يكون ظرفي وغير فعال بنفس القدرة, مما يؤدي إلى اعتدال نسبي في الوزن و مستوى الهرمونات 10 أيام بعد توقف المعاملة. ثاني نقطة مهمة استخلصت من نتائج هذه الدراسة هي عدم فعالية مادة الكلونازيبام عند الفأرات الغير حوامل المعاملة بالتولوين مما يدل على إحداث خلل في العصبي. يبدو أن الحمل يلعب دورا كبيرا في حماية العضوية, الغدية العصبية اتجاه الأضرار GABA مسار الفيزيولوجية الملحقة جراء تجرع الفأرات لمادة التولوين السامة. هذه الحماية, قد تزيد من فعاليتها البعض من Neuroséroides هرمونات الحمل تم اكتشافها مؤخرا تدعى بهرمونات جنسية عصبية

**الكلمات المفتاحية:** اختبار السباحة الملزمة- بروجسترون- تولوين- الحمل.

## 1. INTRODUCTION

Chez la femme, la dépression et l'anxiété augmentent durant la période périnatale (**Savage J et al ., 2010**) et après l'accouchement. A ce titre, il a été rapporté que ces changements comportementaux sont probablement tributaires des variations des niveaux de progestérone plasmatique (**Miguel M.H ., Patricia T.A.N., 2001 ; Andrade S et all ., 2010**) Chez les rats femelles, la gestation engendre des changements comportementaux en réponse aux différents stimuli de l'environnement (**Fleming A.S ., Luebke C., 1981 ; Galea et al.,2000**) ont constaté une augmentation des performances mémoratives au test du labyrinthe de Morris. Une réduction de l'anxiété a été également signalée au labyrinthe en croix surélevé (**Fernández-Guasti A ., Picazo O., 1999**). Au test de la nage forcée, la progestérone semble avoir un effet antidépresseur-like (**Bernardi M et al., 1989 ; Molina M et al.,2000 ; Porsolt R.D et al.,1979**). Ces résultats suggèrent que la gestation peut procurer, ou encore semble procurer à l'organisme une barrière protectrice en réponse aux changements perpétuelles de l'environnement. Cette protection se ferait, a priori, via la production de stéroïdes dits neuroactifs (progestérone et ses métabolites, etc.) et des facteurs de croissance élaborés au cours de la gestation. Il a été démontré que ces produits sont fortement impliqués dans l'installation de l'anxiété (**Neumann I.D et al., 1998**) et de la dépression (**Seeman M.V ., Lang M., 1990 ; Shi C.G et al., 2010**).

La nage forcée, test de l'efficacité des antidépresseurs, représente une situation stressante aversive dont le rat ne peut échapper, et produit l'immobilité, ou désespoir comportemental (**Kirby L.G., Lucki I., 1997 ; Molina-Hernández M et al., 2009**). Les rats montrent également des comportements actifs, comme la nage et l'escalade. Les molécules qui diminuent la durée d'immobilité dans la nage forcée sont considérées comme étant des antidépresseurs efficaces (**Porsolt R.D., 1978**). Au cours du test de la nage forcée ou Forced Swimming Test (FST), les antidépresseurs, produisant une élévation noradrénergique ou dopaminergique prédominante, réduisent l'immobilité par l'augmentation du temps d'escalade (**Lopez C., Lucki I., 2000 ; Kawaura K et al ., 2010**). En revanche, ceux qui activent plutôt la 5-hydroxytryptamine (5HT), réduisent l'immobilité par l'augmentation de la nage (**Detke M.J., 1995**). Les investigations faites sur les effets antidépresseurs-like de la progestérone (**Andrade S et al.,2010; Reddy D.S**

**et al ., 1998)** ou de la gestation (**Neumann I.D et al, 1998**), ont donné des résultats contradictoires où il a été constaté que la progestérone (**Martinez L et al., 1999**) et ses métabolites neurostéroïdes (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one ou alloprégnénolone) entraînent un effet antidépresseur-like au cours de la nage forcée (**Molina-Hernández M et al., 2009; Khisti R.T., Chopde C.T., 2000**). Dans ce contexte, et considérant l'implication de ces produits dans les changements comportementaux qui surviennent au cours de la gestation, nous avons opté pour une démarche expérimentale basée sur l'administration, à des rattes gestantes Wistar, d'une dose élevée ou encore sublétales (1 /4 de la DL 50) d'un produit neurotoxique, le toluène, qui a pour voie privilégiée les neurones GABAergiques (GABA est le seul neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central). Pour tester la modification de la voie GABA ergique suite à l'administration du toluène et le rôle probable joué par la grossesse dans la protection de cette voie, nous avons utilisé, sept jours après la mise bas, le test de la nage forcée (FST), modèle animal de la dépression, que nous avons utilisé avec un agoniste de type antidépresseur GABA ergique, le Clonazépam. Cette procédure nous permettra de confirmer si les produits de la grossesse (NAS: la progestérone) peuvent protéger les voies GABA ergiques.



## **2. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

### **2.1 Matériel biologique**

Des rattes femelles de la souche Wistar (*Rattus rattus*) provenant de l'Institut Pasteur d'Alger ont été utilisées durant cette étude. Les rattes ont été acclimatées aux conditions standards de photopériode naturelle, à une température moyenne de  $20 \pm 4$  °C et une humidité relative de 50-70%.

Après une période d'adaptation de trois semaines, nous avons sélectionné 64 femelles en fonction du poids (environ 250 grammes) et nous les avons réparties en 4 lots expérimentaux: un lot témoin non gestante, un lot traitée au toluène non gestante, un lot gestante et un Lot gestante traitée au toluène. Chaque lot se compose de 16 rattes.

Les rattes des lots gestantes ont été séparées, chacune dans une cage.

Les premiers frottis vaginaux ont été effectués sur toutes les femelles afin d'identifier les phases du cycle œstrien tout en estimant leur réceptivité. L'identification des différentes phases du cycle œstral est effectuée conformément à l'abondance relative des types cellulaires dans le frottis (cellules épithéliales, cellules kératinisées et leucocytes). Après avoir identifié les phases, des rats mâles ont été introduits le soir à 17:00h indépendamment de leur poids, à raison d'un mâle par femelle pour réaliser l'accouplement. La fécondation est confirmée par la présence du bouchon muqueux dans le frottis vaginal qui correspond alors au premier jour de la gestation.

#### **2.1.1 Détermination de la réceptivité sexuelle**

Quotidiennement (de 10h00 à 11h00), après avoir fait l'objet d'un masquage vaginal, les femelles ont été mises brièvement avec un mâle. La réceptivité sexuelle a été déterminée par la réponse des femelles expérimentales à la demande du mâle. Les rattes qui se sont montrées réceptives par leur comportement, ont été considérées comme étant en œstrus, les autres ont été retirées. Le cycle œstral a été déterminé par la cytologie vaginale. Après avoir identifié les phases du cycle œstral, les rattes ont servi à former les 4 lots expérimentaux (n = 16) :

**Lot Basale** : rattes non gestantes : une injection IP d'huile d'olive par jour dès le 1<sup>er</sup> jour ;

**Lot TG** : rattes témoin gestantes : une injection IP d'huile d'olive par jour dès le 1<sup>er</sup> jour ;

**Lot Tol** : rattes toluène non gestantes : une injection IP de toluène, du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour ;

**Lot TolG**: rattes toluène gestantes : une injection IP de toluène du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour.

## **2.2 Administration du toluène**

L'administration du toluène à été réalisée par voie IP à la dose de 332 mg/ kg de poids corporel correspondant au ¼ de la DL50 établie par IUCLID (**IUCLID, 1998**).

Le traitement, qui a duré 10 jours, a été effectué entre le 4<sup>ème</sup> et le 14<sup>ème</sup> jour, à raison d'une injection quotidienne de 2 ml d'une solution renfermant 41.5g de toluène/l d'huile d'olive. Les lots témoins et gestantes non traitées recevaient selon le même protocole, une injection de 2 ml d'huile d'olive.

## **2.3 Tests comportementaux**

### **2.3.1. Test de la nage forcée**

Nous supposons que la grossesse semble jouer un effet modérateur sur la nocivité et la neurotoxicité du toluène, en protégeant la route GABAergique. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le test de Porsolt ou Test de la nage forcée.

Chez le rat, certains changements de comportement qui se produisent peuvent être analysés au cours du test de la nage forcée (FST), qui est conçu pour tester le profil antidépresseur des médicaments. La présente étude vise à analyser, chez les rattes gestantes après la mise bas, l'efficacité d'un agoniste GABAergique, le Clonazépam ; ces changements de comportement sont affichés dans la FST (**Porsolt R.D et al.,1978 ;Porsolt R.D et al.,1977**). Cette approche peut nous confirmer si la voie GABAergique est altérée chez les quatre lots expérimentaux. Les rattes ont été placées dans un aquarium dont l'eau est maintenue à 21-22 °C, d'une profondeur de 35 cm, pour un pré-test de 15 min. Des injections (solution saline ou Clonazépam) sont faites à 24 heure, 5 heure et 1 heure avant un test de

5 min. La profondeur de l'eau de 35 cm pousse les rats à nager ou à flotter. Le Clonazépam est administré par voie sous cutanée dans un volume équivalent à 2 ml / kg à une dose de 0.25 mg / ml (**Porsolt R.D et al., 1978 ; Frih H et al., 2010**). La solution saline (0.9%) a également été administrée par voie sous cutanée dans un volume équivalent à 2 ml / kg. La séance quotidienne de nage a été filmée pour l'analyse comportementale. Les temps d'immobilité, de nage et d'escalade sont calculés.

## **2.4 Prélèvements**

### **2.4.1 Prélèvements sanguins**

Le prélèvement se fait à partir de la veine lacrymale au 7<sup>ème</sup>, 14<sup>ème</sup> jour et après la mise bas (ApMB). Les échantillons sanguins sont recueillis dans les tubes héparinés puis centrifugés à 5000 tr/min et le plasma est mis au congélateur pour le dosage de la LH et de la progestérone plasmatiques.

La LH et la progestérone sont dosées par la méthode conventionnelle ELISA kit BIOTECH.

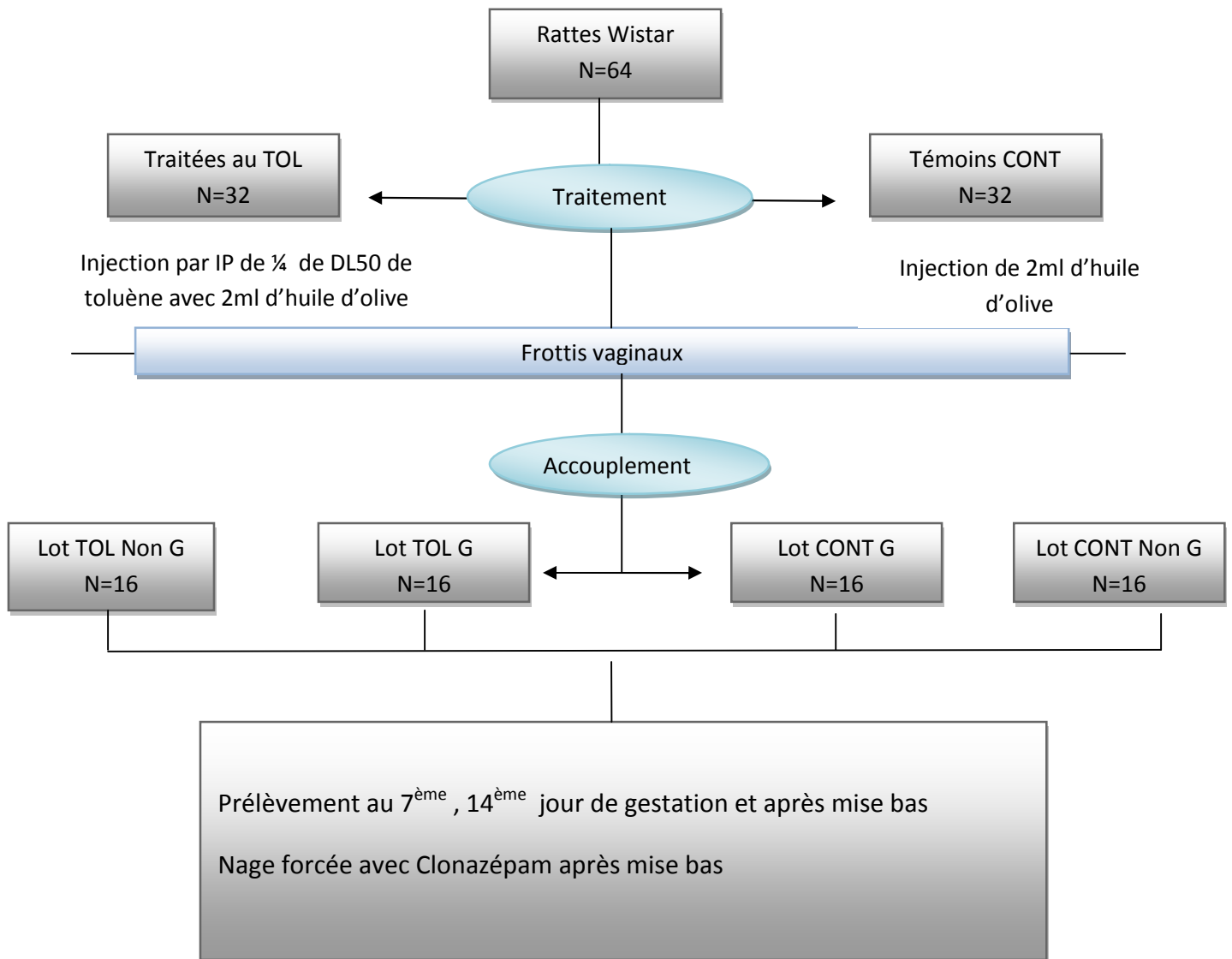
La mesure se fait à l'aide d'un lecteur ELISA TECAN Magellan muni d'un logiciel informatique qui calcule automatiquement la gamme étalon et nous donne directement la valeur de la LH à l'unité désirée.

### **2.4.2 Dissection et prélèvement des organes**

Après sacrifice, l'animal est fixé en décubitus dorsal, une incision est pratiquée depuis l'orifice urogénital jusqu'au manubrium sternal. Les ovaires, les surrénales, le cerveau ont été rapidement prélevés sous glace à l'aide de pinces fines et pesés au moyen d'une balance de précision [Scaltec Instruments, Germany].

## **2.5 Analyse statistique des résultats**

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Un test ANOVA à deux critères de classification pour la comparaison multiples des moyennes a été utilisé, suivi d'un test de Newman et Keuls, en cas de différence significative entre les différents lots. Les résultats des tests de liaison ont été analysés par le test t de Student. Ils sont considérés comme étant significatifs à  $p < 0.05$ .



**Figure 1 : protocole expérimental chez les rattes mères (partie1)**

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Caractérisation des paramètres de la gestation

Les paramètres de la gestation sont estimés par la durée de gestation (j), le gain de poids des rattes gestantes du 4<sup>ème</sup> au 20<sup>ème</sup> jour de la gestation (% et g), la mortalité néonatale (Totale), le nombre moyen de petits par portée, le poids moyen des petits (g) et le pourcentage des petits mâles (Tableau. 1).

Pour ce qui est du gain du poids, on constate qu'il est plus important chez les femelles gestantes non traitées au toluène (TG : 29.1 ± 7.7 vs Tol : 24 .5 ± 6.5). Le nombre moyen de petits par portée est plus élevé chez les témoins que chez les femelles gestantes traitées au toluène (TG : 10.5 ± 0.5 vs TolG : 6.66 ± 1.05). La même constatation est relevée pour le poids moyen des petits (TG : 7 ± 0.12 vs TolG : 5.8 ± 0.09). Le pourcentage des petits mâles est relativement faible chez les rattes traitées au toluène (TG : 42.8 ± 2.2 vs TolG : 36.2 ± 1.3).

**Tableau 1:** Caractérisation des paramètres de la gestation chez le rat Wistar (TG : Témoin gestante et TolG: Toluène gestante) traité au toluène ( m ± s ; n = 16 ).

Lot/ Paramètres	TG	TolG
<b>Durée de gestation (j)</b>	22.1 ± 0.5	23.4 ± 0.3*
<b>Gain de poids (%)</b>	29 .1 ±7.7	24 .5 ±6.5 *
<b>Gain de poids (g)</b>	42.0 ± 0.9	38.0 ±1.5*
<b>Mortalité néonatale (Totale)</b>	1.0 %	3.5% **
<b>Nombre moyen de petits par portée</b>	10.5±0.5	6.7 ±1.05*
<b>Poids moyen des petits (g)</b>	7.0±0.12	5.8 ±0.09*
<b>% des ratons mâles</b>	42.8 ± 2.2	36.2 ± 1.3**

(\* p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001)

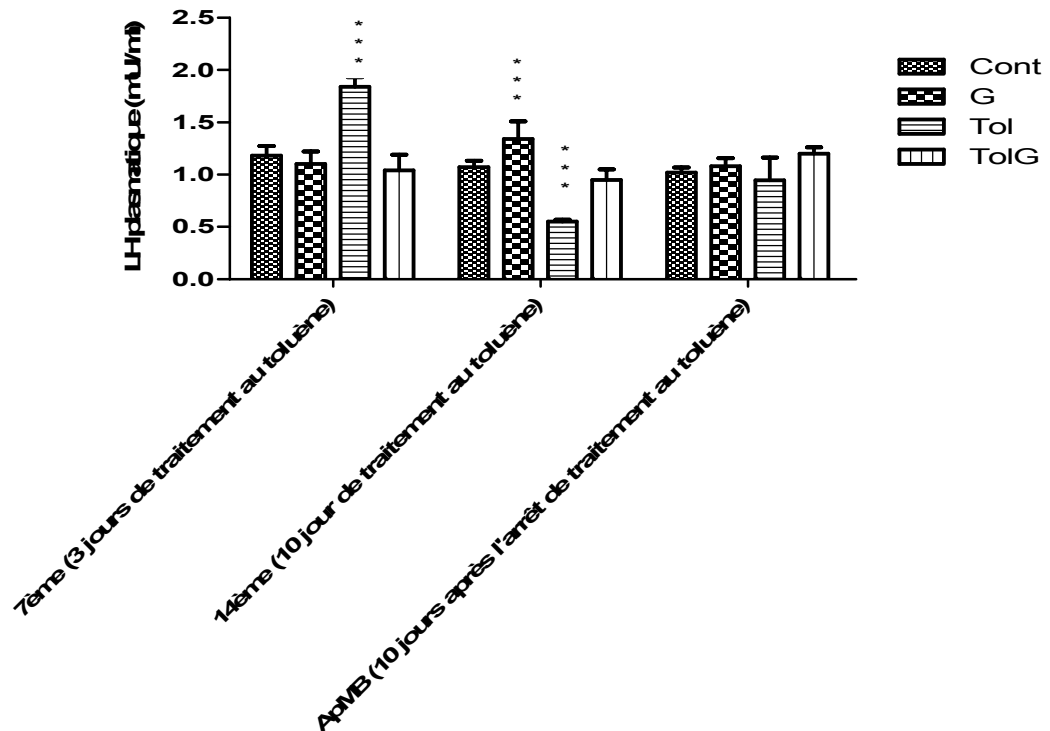
## 3.2 Variation des paramètres hormonaux

### 3.2.1 Variation du taux de LH plasmatique (mUI/ml)

L'appréciation du niveau de la LH a été effectuée au cours du 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour de la gestation et 2 jours après la mise bas (ApMB) (Fig. 2).

Au 7<sup>ème</sup> jour du prélèvement (qui correspond au 7<sup>ème</sup> jour de la gestation pour les femelles gestantes et au 3<sup>ème</sup> jour du traitement au toluène pour tous les animaux), le traitement au toluène seul (sans gestation), a provoqué une augmentation très hautement significative des taux de LH plasmatique par rapport aux animaux témoins (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $1.838 \pm 0.094$  vs Basale, 7<sup>ème</sup> :  $1.18 \pm 0,095$ ). Ce taux s'effondre au 14<sup>ème</sup> jour (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $1.838 \pm 0.094$  vs Tol, 14<sup>ème</sup> :  $0.55 \pm 0.02$ ), avant de redevenir normal 10 jours après l'arrêt du traitement (Basale, ApMB :  $1.02 \pm 0.047$  vs Tol, ApMB :  $0.944 \pm 0.22$ ). La gestation seule a provoqué une augmentation significative du taux de LH au 14<sup>ème</sup> jour (TG, 14<sup>ème</sup> :  $1.34 \pm 0.17$  vs Basale, 14<sup>ème</sup> :  $1.07 \pm 0.063$ ).

Associé à la gestation, le traitement au toluène ne semble pas affecter les taux de LH plasmatique et aucune différence significative n'a été enregistrée après la mise bas.



**Figure 2.** Variation du taux de la LH plasmatique (mUI/ml) suite au traitement au toluène du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7<sup>ème</sup> jour, 14<sup>ème</sup> jour et après mise bas (ApMB) ( $m \pm s$ ;  $n=16$ ) (\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

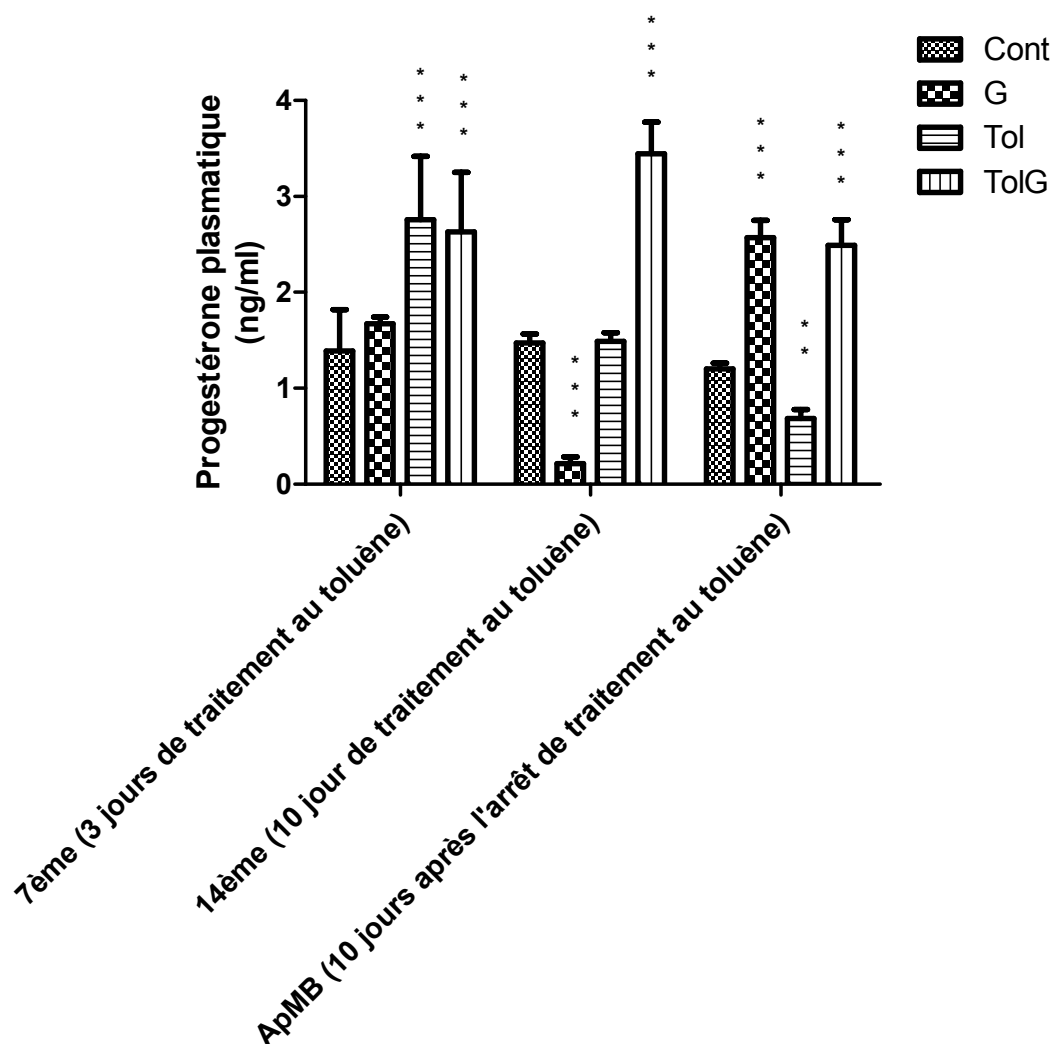
### 3.2.2 Variation du taux de la progestérone plasmatique (ng/ml)

Les variations de la progestéronémie (Fig. 3) semblent être plus sensibles, aussi bien à la gestation, qu'au traitement au toluène.

Au 7<sup>ème</sup> jour du prélèvement, le traitement au toluène (chez les deux groupes : gestant et non gestant) a provoqué une augmentation très hautement significative des taux de progestérone plasmatique par rapport aux animaux témoins (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $2.757 \pm 0.66$  ; TolG, 7<sup>ème</sup> :  $2.632 \pm 0.62$  vs Basale, 7<sup>ème</sup> :  $1.39 \pm 0.17$ ). Ce taux s'effondre progressivement, même après l'arrêt du traitement, pour atteindre une valeur très basse (Tol, ApMB :  $0.684 \pm 0.094$  vs Basale, ApMB :  $1.201 \pm 0.062$ ).

Associé à la gestation, au 14<sup>ème</sup> jour, le traitement au toluène a provoqué une fluctuation inverse des taux de progestérone plasmatique par rapport à la gestation seule (TG, 14<sup>ème</sup> :  $0.216 \pm 0.07$ ; TolG, 14<sup>ème</sup> :  $3.444 \pm 0.33$  vs Basale, 14<sup>ème</sup> :  $1.47 \pm 0.094$ ).

L'arrêt du traitement a engendré un rétablissement des taux de progestérone plasmatique chez les rattes gestantes (TG, ApMB :  $2.571 \pm 0.18$ ; TolG, ApMB:  $2.49 \pm 0.27$  vs Basale, ApMB:  $1.201 \pm 0.062$ ).



**Figure 3.** Variation du taux de la progestérone plasmatique (ng/ml) suite au traitement au toluène du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7<sup>ème</sup> jour, 14<sup>ème</sup> jour et après mise bas (ApMB) ( $m \pm s$ ;  $n=16$ )  
 (\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )

### 3.3 Variation des paramètres de la nage forcée

Le tableau 2 montre une efficacité du traitement au Clonazepam chez les rattes témoins non gestantes, d'où réduction importante du temps d'immobilité (Basale



sans Clonazepam :  $249.56 \pm 32.14$  vs Basale + Clonazepam  $127.74 \pm 52.67$ ). Le Clonazepam s'avère efficace également chez tous les autres groupes de rattes (Basale sans Clonazepam:  $249.56 \pm 32.14$  vs TG + Clonazepam:  $119.24 \pm 2.32$  ; TolG + Clonazepam:  $155.06 \pm 30.77$ ) sauf chez les rattes non gestantes traitées au toluène, où aucune différence significative au niveau du temps d'immobilité calculé, n'a été observée (Basale sans Clonazepam:  $249.56 \pm 32.14$  vs Tol + Clonazepam:  $257.46 \pm 21.57$ ) (Tableau. 2).

**Tableau 2 : Effet du Clonazepam (agoniste GABAergique) sur les paramètres de la nage forcée chez les rattes Wistar Témoins non gestantes et gestantes (Basale et TG) et traitées au toluène non gestantes et gestantes (Tol, TolG) ( $m \pm s$  ; n=16).**

Comportement	Temps de nage (sec)	Temps d'immobilité (sec)	Temps d'escalade (sec)
<b>Basale sans Clonazepam</b>	$32.450 \pm 12.69$	$249.560 \pm 32.14$	$47.865 \pm 12.57$
<b>Basale + Clonazepam</b>	$98.080 \pm 29.73$ ***	$127.740 \pm 52.67$ **	$74.170 \pm 22.94$ ***
<b>TG + Clonazepam</b>	$127.200 \pm 0,63$ ***	$119.240 \pm 2,32$ ***	$53.560 \pm 2.52$
<b>Tol + Clonazepam</b>	$42.180 \pm 11.67$	$257.460 \pm 21.57$	$20.350 \pm 26.92$
<b>TolG + Clonazepam</b>	$77.140 \pm 29.09$ *	$155.060 \pm 30.77$ ***	$67.820 \pm 15.88$

(\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### 3.4 Variation du poids relatif des ovaires, surrénales et cerveau

Le tableau 3 montre une augmentation du poids des ovaires chez les rattes traitées au toluène par rapport au témoin (Basale :  $0.0113 \pm 0.0052$  vs Tol :  $0.04675 \pm 0.233$  vs TolG :  $0.035 \pm 0.0176$ ).

Les résultats concernant le poids du cerveau (Tableau. 3) montrent que le traitement au toluène entraîne une réduction du poids du cerveau chez les rattes non gestantes traitées au toluène (Basale :  $0.826 \pm 0.0452$  vs Tol :  $0.67 \pm 0.013$ ). Cette diminution est moins importante chez les femelles gestantes traitées au toluène (Basale :  $0.826 \pm 0.0452$  vs TolG :  $0.75 \pm 0.107$ ).

Le poids des surrénales (Tableau. 3) augmente légèrement après gestation (TG :  $0.034 \pm 0.003$  vs Basale :  $0.020 \pm 0.007$ ). Le traitement au toluène, en dehors de toute gestation, augmente considérablement le poids des surrénales (Tol :  $0.089 \pm 0.124$ ). Administré, au cours de la gestation, le toluène rétablit le poids des surrénales (TG :  $0.034 \pm 0.003$  vs TolG :  $0.031 \pm 0.007$ ).

**Tableau 3: Variation du poids relatif (g/100g de rat) des ovaires, cerveau et surrénales chez les rattes gestantes et non gestantes traitées au toluène**

( $m \pm s$  ;  $n=16$ ).

Lot/Poids relatif (g/100g PV)	Basale	TG	Tol	TolG
<b>Ovaires</b>	$0.0113 \pm 0.0052$	$0.0240 \pm 0.0030$	$0.0467 \pm 0.2330^{**}$	$0.0350 \pm 0.0176$
<b>Cerveau</b>	$0.8260 \pm 0.0452$	$0.8580 \pm 0.0100$	$0.6700 \pm 0.0130^*$	$0.7500 \pm 0.1070$
<b>Surrénales</b>	$0.0200 \pm 0.0070$	$0.0340 \pm 0.0030$	$0.0890 \pm 0.1240^{***}$	$0.0310 \pm 0.0070$

(\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

#### 4. DISCUSSION

Dans notre étude, l'application d'un stress subchronique au toluène (pendant 10 jours), a provoqué des perturbations endocriniennes (LH et progestérone plasmatiques) et pondérales (cerveau, ovaires et surrénales) qui semblent être irréversibles chez les animaux non gravides traités au toluène seul. Par contre, le même traitement associé à la gestation laisse apparaître un effet réparateur dix jours après l'arrêt du traitement.

Pour ce qui est des variations pondérales, nous avons relevé une diminution du poids du cerveau et une augmentation du poids des ovaires et des surrénales chez les animaux traités au toluène seul. Ce résultat n'a pas été obtenu chez les rattes gestantes traitées au toluène où nous avons enregistré une reprise relative du poids du cerveau et des ovaires. En outre, le poids relatif des surrénales, n'a pas été affecté chez le lot TolG. Il semblerait que, dans le contexte de la gestation, les réponses adaptatives de l'animal liées à l'administration du toluène soient différentes de celles obtenues chez les animaux non gravides.

Un autre résultat qui mérite d'être signalé et qui est en faveur de notre hypothèse, est la variation des paramètres hormonaux (LH et progestérone plasmatiques) où un effondrement des taux de progestérone est noté au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez le lot TG. A la mise bas, nous avons constaté un rétablissement des niveaux de progestérone. Des tendances inverses des variations des taux de LH plasmatique ont été obtenues après la mise bas, avec une augmentation des taux au 14<sup>ème</sup> jour de gestation, puis un retour à la normale. Ceci dénote d'un bon état de fonctionnement de la boucle du rétrocontrôle de l'axe gonadotrope.

Le traitement au toluène seul (Tol) a provoqué une augmentation des taux de progestérone plasmatique par rapport aux animaux témoins. Ce taux s'effondre progressivement, même après l'arrêt du traitement, pour atteindre une valeur très basse. Les taux de LH ne semblent pas être aussi affectés et nous avons enregistré un rétablissement des taux 10 jours après l'arrêt du traitement. Une dissociation entre la stimulation hypothalamique et la réponse gonadotrope périphérique a été observée (LH normale, progestérone diminuée), supposant une altération possible des récepteurs centraux aux stéroïdes.

Associé à la gestation, au 14<sup>ème</sup> jour, le traitement au toluène a provoqué des fluctuations inverses des taux de progestérone plasmatique par rapport à celles trouvées chez les rattes gestantes non traitées. L'arrêt du traitement au toluène a engendré un rétablissement des taux de progestérone plasmatique chez le groupe d'animaux gestants.

Enfin, le point fort de nos résultats est celui de la nage forcée où nous avons testé l'efficacité d'un agoniste GABAergique, le Clonazepam. A ce niveau, le Clonazepam s'est avéré inefficace chez le lot Tol. Par contre, l'administration de cet antidépresseur aux rattes gestantes traitées au toluène réduit considérablement le temps d'immobilité, d'où son efficacité.

La question qui se pose est : Quels sont les mécanismes qui conduisent à cet effet modérateur de la gestation sur la nocivité du toluène ? Les éléments de réponse à cette question se résument dans les points suivants : Instabilité du comportement de l'animal au cours des différentes phases de la gestation, cette question ayant été soulevée depuis des années aussi bien chez l'homme que chez l'animal (**Numan M., 1978 ; Baulieu E.E et al., 2001**).

Ce comportement suscité est probablement tributaire de fluctuations hormonales (**Al-Khoury H., Greenstein B.D., 1985 ; Brown T.J., MacLusky N.J., 1994**) et neurochimiques (**Majewska M.D., 1992**), et il a été observé une expression intracellulaire de la progestérone dans les différentes régions du cerveau (**Kastrup Y et al .,1999 ; Numan M et al.,1999**) ainsi que la découverte de l'action non génomique de la progestérone au niveau central (**DeBold J.F., Frye C.A.,1994 ; Ramirez V.D., Zheng J., 1996**). La progestérone joue un rôle très important dans la modulation neurochimique du GABAa (**Majewska M.D., 1992 ; Smith S.S et al ., 1998 ; Mellon S.H., 2007**) et favorise la plasticité neuronale (**Concas A et al.,1999**). Aussi, la réduction des concentrations basales du GABA au cours de la gestation semble avoir un rôle protecteur des neurones GABAergique.

Toutes ces données sont en faveur de l'implication de la progestérone et ses métabolites, en qualité d'hormones neuroactives, qui agissent en empruntant des régions localisées du cerveau, particulièrement le système GABAergique. En effet, les hormones st ro ides influencent la survie des neurones, la croissance des neurites et la formation des raccordements synaptiques pendant la vie

embryonnaire et postnatale, puis continuent ensuite à induire la plasticité du système nerveux adulte (**Garcia-Segura L.M et al ., 1999-Toran-Allerand C.D., 1996**). En particulier, après des dommages neuronaux ou pendant les maladies anxieuses, les stéroïdes peuvent exercer des actions protectrices sur des neurones et des cellules gliales et favoriser des processus régénérateurs (**De Nicola A.F., 1993**). Cependant, dans des circonstances particulières, quelques stéroïdes peuvent également entraîner des dommages du tissu nerveux. Les stéroïdes exercent leurs effets sur le système nerveux en réglant l'expression des gènes hormone-sensibles spécifiques ou en modulant l'activité des récepteurs de neurotransmetteurs, en particulier le type A -acide aminobutyrique (GABA<sub>A</sub>), la D-aspartate n-méthylque (NMDA).

Ainsi, la progestérone favorise la formation de nouvelles gaines de myéline après la lésion du nerf sciatique du rongeur en activant la transcription des gènes codant pour les protéines importantes de la myéline (**Désarnaud F et al., 1998**). Le sulfate de prégnénolone et la 3,5-tétrahydroprogestérone exercent leurs effets psycho-pharmacologiques en modulant des récepteurs de GABA<sub>A</sub>. Ils ont été abordés dans l'anxiété, dans la dépression et la mémoire (**Baulieu E.E., 1999**). Des stéroïdes qui modulent l'activité des récepteurs de neurotransmetteurs et qui changent l'excitabilité des cellules nerveuses ont été qualifiés en tant que neuroactifs (**Paul S.M., Purdy R.H., 1992**).

Des stéroïdes agissant sur des neurones et des cellules gliales sont produits par les glandes endocrines stéroïdogènes telles que les gonades et les surrénales, et ils atteignent le cerveau et les nerfs périphériques par voie sanguine. Vu leur nature lipophile, ils traversent facilement les barrières hémato-encéphaliques et s'accumulent rapidement dans les tissus nerveux après administration systémique, excepté les stéroïdes conjugués tels que des esters de sulfate.

En outre, quelques stéroïdes peuvent être formés localement dans le cerveau et dans des nerfs périphériques, par le métabolisme des hormones de circulation ou par la synthèse de novo du cholestérol. Ces derniers ont été appelés des neurostéroïdes. Cette limite ne désigne pas une classe particulière de stéroïdes, mais se rapporte seulement à leur site de synthèse : le système nerveux (**Baulieu E.E., 1991 ; Landa A.I et al.,2009**). Par exemple, la progestérone qui est présente dans le cerveau provient des ovaires et des surrénales et de la synthèse locale

par des neurones et des cellules gliales. Un rôle physiologique pour la synthèse locale des neurostéroïdes dans le système nerveux a seulement été documenté dans quelques cas.

## 5. CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons mis l'accent sur les actions trophiques et protectrices de la gestation, qui agirait probablement par le biais des produits abondamment synthétisés durant cette phase critique et cruciale du développement, en l'occurrence les hormones stéroïdes : prégnénolone, progestérone, déhydroépiandrostérone (DHEA) et leurs métabolites et esters réduits de sulfate. Il semble que la gestation joue un effet modérateur sur la nocivité et la neurotoxicité du toluène, causées probablement par la sécrétion de divers facteurs (hormones stéroïdes neurostéroïdes). Bien que cette étude préliminaire soit limitée à ces stéroïdes (en raison de leur production abondante durant la gestation), sans pour autant aborder les autres facteurs de gestation susceptibles d'intervenir dans ces phénomènes réparateurs (facteurs de croissance, cytokines, etc.), nous avons néanmoins, ouvert le champ à beaucoup de spéculations quant aux rapports multidirectionnels se situant à l'interface de l'étude du comportement animal et des mécanismes physiologiques sous-jacents.

Il serait souhaitable de mener des études complémentaires afin de mieux cerner les mécanismes mis en jeu dans les processus modérateurs de la gestation de la nocivité des xénobiotiques.

## Chapitre 2:

### **Effets du stress prénatal au toluène sur le développement de la progéniture des rats Wistar : Aspect neuro-comportemental et physiologique.**

#### **RESUME**

**Objectifs :** Les conséquences physiques et neuromotrices du stress prénatal sur la progéniture des rattes Wistar traitées au toluène.

**Méthodes :** Un sixième de la concentration de la DL<sub>50</sub> du toluène a été injectée quotidiennement en IP chez les rattes gestantes (G) du 07<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour. Des rattes gestantes non traitées ont servi comme contrôles. Après mises bas certains paramètres de gestation ont été mesurés : la taille de la portée et le sexe ratio, ainsi que les paramètres du développement physique chez les nouveaux nés (l'évolution pondérale, l'éruption des incisives, ouverture des yeux). Les indices neuromoteurs ont été appréciés grâce à une batterie de tests (test de retournement, test d'agrippement, test de réaction antigravitaire et le test de suspension). L'indice du développement comportemental et cognitif a été suivi en deux temps, à l'âge juvénile : PN45 par le test d'open Field et le test de Morris réalisé le PN50 et PN 51 ; à l'âge adulte (à partir du PN70) les tests suivants : test du champs ouverts, test du labyrinthe en croix surélevée, test Nage forcée et le test aquatique de Morris.

**Résultats :** Nos résultats ont montré qu'il y a une diminution dans la taille de la portée et le sexe ratio et un retard dans le développement physique des nouveaux nés. Pour ce qui concerne les tests neuromoteurs on signale un déficit pour tous les tests à l'exception le test de suspension. Et une altération du système nerveux central(SNC). Effet anxiolytique en openfield et absence d'aberration mémorative dans le test de Morris à l'âge juvénile.

**Conclusion :** Le traitement prénatal au toluène provoque chez la progéniture des déficits physiques et neuromoteurs importants précurseurs à des troubles comportementaux à l'âge juvénile qui semble disparaître à l'âge adulte.

**Mots clés :** Gestation, toluène, stress prénatale, progéniture, batterie de tests.



## **Abstract**

**Objectives:** The physical and neuromotor of prenatal stress on offspring of Wistar rat treated with toluene.

**Methods:** Methods: One-sixth of the concentration of the LD50 of toluene was injected daily IP in pregnant rats (G) of the 07th to 14th day . Of pregnant rats served as untreated controls. After farrowing parameters of gestation were measured: the litter size and sex ratio , and the parameters of physical development among new born ( the weight evolution, incisor eruption , eye opening ) . Neuromotor signs were assessed using a battery of tests ( turning , gripping test, test and test antigravitic reaction suspension index of cognitive and behavioral development was followed in two stages, at the age juvenile : PN45 by the open field test and test Morris made the PN50 and PN 51; adulthood (from PN70 ) the following tests: the open fields , in an elevated maze test cross test forced swim test and the Morris water .

**Results:** Our results showed that there was a decrease in litter size and sex ratio and delayed physical development of newborns. As regards the tests are reported neuromotor deficit for all tests except the test suspension. And an alteration of the central nervous system (CNS). Anxiolytic in open field and no commemorative aberration in the Morris water maze in the juvenile age effect.

**Conclusion:** Prenatal treatment with toluene causes offspring physical and neuromotor deficits important precursors to behavioral disorders in the juvenile age that seems to disappear in adulthood.

**Keywords:** Pregnancy, toluene, prenatal stress, offspring, battery of tests.

**أهداف:** العواقب البدنية والحركية من الإجهاد قبل الولادة في ذرية الفئران يستر تعامل مع التولوين.

**الأساليب:** تم حقن سدس تركيز LD50 من التولوين IP يوميا في الفئران الحوامل (G) من 07 إلى 14 يوم . من الفئران الحوامل خدم والضوابط غير المعالجة . بعد تم قياس المعلمات التخنيص من الحمل : حجم القمامة و نسبة الجنس ، و المعلمات من النمو البدني بين المولودين الجدد ( تطور الوزن، و اندلاع القاطعة ، وفتح العين) . تم تقييم علامات حركي باستخدام مجموعة من الاختبارات ( تحول، تجتاح الاختبار، واختبار رد فعل مؤشر تعليق antigravitic التنمية المعرفية والسلوكية وأعقب على مرحلتين ، في سن الأحداث : PN45 قبل الاختبار الميداني المفتوحة و اختبار موريس جعلت PN50 و PN 51؛ البلوغ ( من PN70 ) الاختبارات التالية : الحقول المفتوحة ، في متاهة مرتفعة اختبار اختبار عبر اختبار السباحة القسري و المياه موريس.

أظهرت نتائجنا أن هناك انخفاضا في حجم القمامة و نسبة الجنس وتأخر النمو البدني من الأطفال حديثي الولادة :

**النتائج.** فيما يتعلق تردد الاختبارات عجز حركي لجميع الاختبارات باستثناء اختبار التعليق . و تغيير في الجهاز العصبي المركزي ( CNS) . مزيل القلق في حقل مفتوح ولا انحراف التذكارية في متاهة موريس المائية في سن تأثير الأحداث.

**الاستنتاج :** العلاج قبل الولادة مع التولوين يسبب ذرية البدنية و العجز حركي السلائف المهم أن اضطرابات سلوكية في سن الأحداث التي يبدو أنها تختفي في مرحلة البلوغ .

**الكلمات الرئيسية :** الحمل ، التولوين ، قبل الولادة البطارية الإجهاد ذرية من الاختبارات.

## 1. Introduction

Pour mieux comprendre la toxicité du toluène sur la reproduction, des essais ont été réalisés sur la ratte en période de gestation. Une majorité de travaux a rapporté que le toluène était très peu toxique chez les femelles gestantes tout en signalant des anomalies et des retards de développement chez la progéniture. Ainsi **Ungvary (1984)** rapporte que le toluène traverse la barrière placentaire pour atteindre des proportions avoisinant les 75% par rapport à celles mesurées dans le sang maternel. Dans le même ordre d'idée, **Da-silva et al., (1991)** montrent que le toluène se trouve dans le lait maternel à des concentrations 5 fois plus élevées que celles mesurées dans le sang.

Dans une étude de **l'API (1978)**, il a été rapporté que l'administration du toluène chez les rattes gestantes ne provoque pas de toxicité maternelle. Néanmoins, il a été relevé des modifications du sex ratio chez le fœtus, une embryotoxité et un retard pondéral fœtal. Dans des études similaires (**Gospe et al., 1994 ; 1996 ; 1998**) trouvent que le traitement provoque chez le fœtus une diminution pondérale, des retards d'ossification du squelette, des cerveaux de petite taille et un défaut de myéline.

Sur le plan neurotoxique plusieurs études rapportent que le toluène affecte le système nerveux central. Ainsi, **Balster (1998)** rapporte que le toluène est capable de franchir la barrière hémato-encéphalique et procure un effet similaire à celui des sédatifs, de l'alcool ou des benzodiazépines. L'exposition au toluène provoque selon **Deleu et al. (2000)**, **Kamran et al. (1998)** et **Yamanouchi et al. (1995)** un dysfonctionnement cérébral et une atrophie hippocampale et du cerveau. De faibles concentrations de toluène provoquent un déficit persistant dans l'apprentissage spatial et de la mémoire chez **l'homme (Chouaniere et al., 2002; Lee et al., 2003; Yu et al., 2004)**.

Dans une étude récente **Frih et al. (2012)** trouvent que l'effet du toluène, lorsqu'il est administré au cours de la gestation, n'est pas le même que lorsqu'il est administré aux femelles non gestantes. Cette étude montre, que le toluène provoque chez les femelles non gravides une altération des récepteurs GABA<sub>A</sub> et provoque l'anxiété. Par contre, chez les femelles gestantes, cette altération de la voie GABA-ergique n'apparaît pas, et ceci a été expliqué par l'action des stéroïdes neuroactifs comme l'allopregnolone, dont la sécrétion se trouve accrue en fin de

gestation. Parmi les effets de ces neurostéroïde il est signalé une régénération des récepteurs GABA<sub>a</sub>.

L'exposition des femelles gestantes au toluène a des conséquences importantes sur la qualité de la progéniture. Ainsi, plusieurs auteurs signalent une taille de la portée plus réduite, la modification du sex ratio, un retard de développement, des troubles neuromoteurs et plus tard, des troubles comportementaux. Dans ce contexte, nous citerons les travaux de **Scott et al. (2004)** qui rapportent, suite à une exposition au toluène comprise entre le DG 08 et DG 20, une baisse du poids corporel, un retard dans l'ouverture des yeux et l'éruption des incisives. Cette étude rapporte également des troubles neuromoteurs comme la géotaxie la surface righting et le grip strand. Dans une étude ultérieure, ce même auteur, travaillant dans les mêmes conditions, trouve que l'administration du toluène provoque un déficit comportemental (**Scott et al., 2009**). Sur un autre plan, **Hass et al. (1999)** et **Houghard et al. (1999)**, travaillant chez les rates gestantes exposées au toluène respectivement entre J17-J18 et J17-J20, trouvent que l'exposition au toluène provoque une baisse de poids des petits et une modification du sex ratio. Ils signalent également un déficit neuromoteur qui est non révélé par l'Open Field test. Cependant les rats soumis au Water maze test de Morris présentent un déficit dans l'apprentissage spatial.

C'est dans ce contexte que nous avons initié notre étude qui consiste à mesurer quelques paramètres de développement (sex ratio ; taille de la portée ; évolution pondérale ; ouvertures des yeux ; éruption des incisives) et de comportement chez les jeunes rats issus de femelles exposées à une dose de toluène de 1/6 de la DL<sub>50</sub> estimée à partir d'une batterie de tests (Test retournement, Test d'agrippement, Test de réaction antigravitaire et Test de suspension). Et de poursuivre la progression de l'effet du toluène à l'âge adulte PN70 grâce à des tests comportementaux : Test open field, Plus maze test et nage forcé pour évaluer respectivement, l'activité locomotrice, l'anxiété et la dépression. Des investissements immuno-endocriniennes, en fonction des moyens disponibles, ont été réalisés dans le but d'apprécier le rôle du système immunitaire dans ce type de modèle de stress prénatal.

## **2. Matériel et méthode**

### **2.1. Matériels Biologiques**

Vingt six (treize femelles et 13 mâles) rats blancs provenant de l'institut pasteur d'Alger (Couba). Pesant entre 150-250g ont été choisis pour notre étude. Le *Rattus norvegicus* ou norvégien est une espèce génétiquement sélectionnée, issue par croisement, de race albinos (**Festing, M.F.W., 1979**). C'est un rongeur nocturne, omnivore et coprophage. Il possède une large tête, de petites oreilles des yeux rouges globuleux et une petite queue. Il se reproduit pendant toute l'année et la gestation dure 21 jours.

Les animaux sont hébergés par cage de six, dans des conditions standards (température  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , cycle normal lumière-obscurité 12h :12h avec début de nuit à 19h). Les cages utilisées sont en plastique ayant un couvercle en acier inoxydable, munies de biberons. Une épaisse couche de sciure est déposée au fond des cages et renouvelée tous les 3 à 4 jours. Les rats Wistar sont nourris quotidiennement par un aliment, sous forme de bâtonnet d'origine commerciale, », constituée de pelletes à base de maïs, son, remoulage, soja et complément minéral vitaminé (CMV) (Sarl la production locale d'aliment pour souris et rats Bouzaréah- Alger) et reçoivent de l'eau « ad libitum

Après deux semaines d'adaptation, les femelles et les males sont mis en accouplement, deux par cage, le jour d'insémination est considéré le jour 0 de gestation (DG0). La mise bas se manifeste à terme de 21 jour, le jour de naissance est le jour postnatal 0 (PN0). Les animaux ont été soumis à différentes séries d'étude, toutes les procédures appliquées ont été approuvées par le comité scientifique de l'université.

Les animaux sont répartis aléatoirement en deux lots, lot traité au toluène (lot Tol) et le lot control (lot Cont) c'est le lot témoin.

### **2.2. Effet sur le développement physique des nouveaux nés**

Parmi les indicateurs du développement physique, nous avons réalisé la mesure des 3 paramètres les plus importants (**Roberts et al., 1997 ; Da-Silva et al., 1990**) :

- a- L'évolution pondérale des jeunes est réalisée pendant les jours : J2 ; J5 ; J9 ; J12 ; J15 et J18, à l'aide d'une balance de précision (**BIO BLOCK Scientific**).
- b- Les dates de percée des incisives : cette mesure s'effectue entre le 8<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour après la naissance par simple appréciation visuelle (**Thiel et al., 1997**).
- c- La vérification de l'ouverture des yeux : elle s'effectue entre le 12<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> jour après la mise bas à partir de l'observation des ratons (**Sorige et al., 1998**).

Ces trois paramètres constituent de bons indicateurs du développement physique de la descendance

## **2.3. Effet sur les paramètres Neuromoteurs des ratons**

### **2.3.1. Test de retournement**

Il est réalisé le 3<sup>ème</sup> jour du post natal (PN 3) ; Au cours de ce test le rat est déposé sur le dos et tente ensuite de revenir à la position dorso-ventral. Le but est de mesurer la maturation neuro-musculaire par le calcul du temps nécessaire à effectuer un retournement.

### **2.3.2. Test d'agrippement**

Il s'effectue le 4<sup>ème</sup> jour du post natal (PN 4) ; ce test sert à mesurer la force musculaire des membres antérieurs. Le dispositif est composé d'un plateau en bois couvert par une grille en plastique, fixé sur un support en bois et muni d'un rapporteur. Le rat est déposé au milieu, s'agrippe sur la grille une fois le plateau est mis en rotation. La variable mesurée est l'angle atteint par rapport à l'horizontale quand le jeune rat cesse décroche et tombe. La mesure de l'angle est exprimée en degré (**ETAP, 2001**).

### **2.3.3. Test de réaction antigravitaire**

Il s'effectue le jour 9 du post natal (PN 9) dans le but de mesurer l'équilibration et la maturation du cervelet et des canaux semi-circulaires de l'oreille interne. On place le jeune raton « la tête vers le bas » sur un plan incliné à 20° ; l'animal doit pivoter pour se retrouver « la tête vers le haut » ; on mesure le temps nécessaire pour que l'animal effectue un demi-tour complet de 180° (**Etap, 2001**).

#### **2.3.4. Test de suspension**

Ce test est réalisé le jour 12 du post natal (PN 12) pour la mesure de la force musculaire et de la fatigabilité du raton. Le mécanisme employé est formé d'un fil en coton tendu entre deux supports en bois. Les pattes antérieures du jeune rat sont amenés au contact du fil à 40 cm du sol, cette stimulation déclenche une réaction d'agrippement et l'animal se suspend au fil pendant un laps de temps puis lâche prise à cause de la fatigue. La variable mesurée est la durée de suspension (temps en seconde) à l'aide d'un chronomètre (Etap, 2001).

#### **2.4. Effet sur le développement comportemental et cognitif des jeunes**

##### **2.4.1. Test des champs ouverts (PN45)**

Ce test permet d'évaluer sur des sessions de test de 5 minutes, les troubles de l'activité locomotrice, du comportement exploratoire et de l'état émotionnel des animaux

Le dispositif utilisé est une enceinte carrée en plexiglas de 70 cm de long et de 50 cm de haut. Il est divisé en 7 parties de même superficie : 1 partie centrale et 6 parties périphériques. La partie centrale sert de point de départ aux animaux à chaque test.

Les variables étudiées sont le nombre des cases traversées, le nombre de redressement (activité locomotrice et exploratrice) et le nombre de passage dans la case centrale du dispositif (critère d'anxiété).

##### **2.4.2. Test de Morris**

Le dispositif employé est un bassin de 150 m de diamètre remplis d'eau. Le rat à l'intérieur nage pour fuir le milieu aquatique aversif. Le test se déroule en deux sessions de 5 essais par jour. le PN50 le rejeton apprend à situer l'emplacement d'une plate forme immergée à 2mm à la surface de l'eau et s'y réfugier, la deuxième session le PN51 comporte deux essais au cours des quels la plateforme est retirée et le comportement du rat est filmé pendant 60 seconde (s). Entre chaque essai le rongeur est laissé 30 s de repos sur la plateforme pour lui permettre de prendre des repères spatiaux, indispensable à son orientation dans le dispositif.

## **2.5. Effet du traitement sur le développement cognitif et comportemental des rats à l'âge adulte**

### **2.5.1. Matériel biologiques**

Cinquante six rats pesant en moyenne 200 g , Agé de 70 jours dont 30 issues de mère traitées au toluène (lot Tol) et 26 descendant de mère contrôles (lot Cont ).

Les animaux de sexe différent sont séparés au sevrage et sont logés dans des cages de six dans des conditions standards (température  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , cycle normal lumière-obscurité 12h :12h avec début de nuit à 19h). (Fig.9).

### **2.5.2. Méthodes**

Les animaux subissent une série de tests d'exploration comportementale, endocrinienne et immunologique dans le but d'étudier l'effet du toluène sur le développement et l'évolution des rats à l'âge adulte.

#### **2.5.2.1. Test de freinage à la dexaméthasone (DEX)** (Yehuda et al., 2002)

Corticoïde de synthèse dérivé de cortisone, la dexaméthasone a un effet glucocorticoïde puissant et minéralocorticoïde extrêmement faible. Ils ont un pouvoir freinateur sur la sécrétion de l'ACTH hypophysaire. Elle est administrée par voie intra-péritonéale au volume de 0,2ml par rat (Dexaméthasone Phosphate Sodique, 4mg/ml, Groupe SAIDAL)

Les prélèvements sanguins sont obtenus, à la même heure, avant et après traitement à la Dxm. : - Le premier prélèvement sanguin réalisé avant le traitement à la Dxm, est symbolisé (Pré-DEX) ;

- Le second sanguin obtenu, le lendemain à la même heure, est symbolisé (Post-DEX).

#### **2.5.2.2. Prélèvement**

Les prélèvements sanguins se font par ponction rétro orbitaire de l'œil de l'animal. Grace à des tubes capillaires et tenant compte du poids du rat on peut ainsi prélever jusqu'à 2ml de sang (de 200 à 300 g, on prélève de 2 à 3 ml de sang). Le sang a été recueilli dans les tubes héparines pour la détermination de l' FNS (Formule de Numération Sanguine). Les lectures ont été prises rapidement au compteur automatique de cellules sanguines PCE-210N multiparamètres (18



paramètres; Erma, Tokyo, Japon). En outre, une goutte de sang déposée sur une lame et étalée rapidement a servi au recomptage de certains points par la méthode de May–Grunwald–Giemsa, afin de vérifier la fiabilité de l'appareil. Il est à souligner que l'hématocrite a été contrôlée tout au long des prélèvements puis centrifugés à 4500 tours /minute pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes *Eppendorf* puis mis au congélateur jusqu'au moment du dosage des Immunoglobulines.

### **2.5.3. Etude comportementale**

#### **2.5.3.1. Procédure de la nage forcée (Forced Swimming Test)**

Des conditions stressantes augmentent la vulnérabilité aux épisodes dépressifs chez l'homme et seraient un des facteurs étiologiques de la dépression. En effet, des modèles animaux basés sur l'hypothèse que la dépression est causée par un stress non contrôlé par l'animal, ont été proposés. Ces modèles sont donc étudiés pour tenter de décrire les conséquences neurobiologiques et comportementales néfastes du stress sur le plan émotionnel et comportemental chez les rongeurs. Des altérations fonctionnelles similaires ayant été décrites dans le cas de la dépression chez l'homme où il a été suggéré que le modèle de la nage forcée (FST) permettrait de modéliser certaines formes de dépression. Il s'agit du test de la nage forcée décrit par **Porsolt et al. (1977)**. En effet, l'application du modèle dépressif de Porsolt induit des réponses comportementales que nous tenterons de détailler dans notre travail.

##### **a- Description du test**

Le FST ou Forced swimming test, est un modèle comportemental qui permet de prédire l'efficacité d'un traitement antidépresseur (**Porsolt et al., 1977**). Ce modèle animal, utilisé aussi bien chez le rat que chez la souris, présente cependant des différences de procédure selon l'espèce utilisée. Ce test permet également de mesurer le degré d'état de « dépression » ou plus précisément de l'état de résignation ou de motivation de l'animal.

Le test consiste à placer individuellement le rat dans un aquarium de 40 cm de haut sur 30 cm de large. Ces dimensions permettent de s'assurer que le rat ne pourra pas s'enfuir en s'agrippant aux bordures du dispositif. L'aquarium est rempli d'eau à 25 C°. La hauteur de l'eau atteint 35 cm, pour s'assurer que le rat

ne se serve pas de ses membres inférieurs pour se maintenir à la surface, et donc l'obliger à nager (Fig.4) . Après une phase d'activité vigoureuse (temps d'adaptation), l'animal contrôle cesse de nager et se fige, adoptant un comportement de désespoir. On considère que l'animal est immobile lorsqu'il flotte en position horizontale et ne réalise que des mouvements de faible amplitude, suffisant à maintenir sa tête hors de l'eau.

Le FST se déroule chez le rat en deux phases, le pré-test (FST1) et le test (FST2), séparées par un intervalle de 24 heures au cours duquel le traitement est administré. Lors du pré-test, le rat est placé pendant 15 minutes dans l'aquarium rempli d'eau dont il ne peut s'échapper. A la fin de la session, l'animal est immobile. Le jour suivant, l'animal est replongé dans l'aquarium pendant 5 minutes, période pendant laquelle le temps d'immobilité est enregistré. Un traitement antidépresseur efficace diminue le temps d'immobilité seulement lors du jour du test (**Porsolt et al., 1978 et 1979**).

Récemment, une amélioration du test a été validée. Cette modification propose chez le rat, non seulement d'évaluer l'immobilité posturale, mais aussi les deux comportements actifs impliqués directement dans la diminution de cette immobilité, à savoir la nage et l'escalade.



**Figure 4** Dispositifs de Nage forcée

#### **b- Variables mesurées**

Les différentes variables mesurées durant le FST sont :

- Temps d'immobilité;
- Temps de nage;
- Temps d'escalade.

Le rat est considéré immobile quand il flotte position verticale et ne fait apparaître que son museau pour respirer.

### **2.5.3.2. Procédure du labyrinthe en croix surélevée (Plus Maze Test)**

#### **a- Description du test**

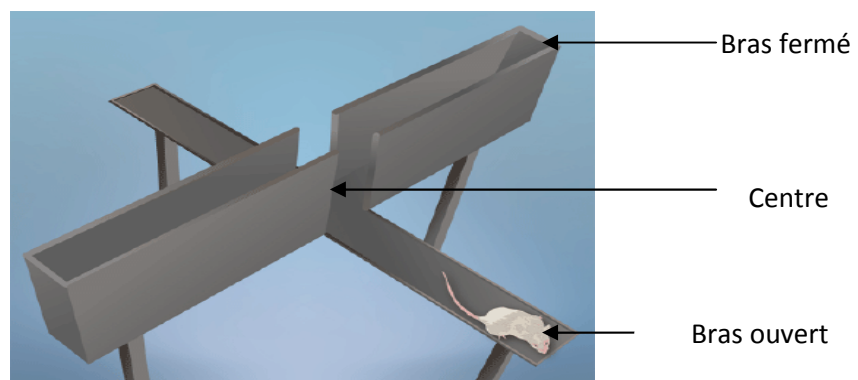
**Montgomery (1955)** décrit l'aversion des rongeurs pour l'espace vide et la hauteur lors des séances d'exploration libre à partir d'un milieu familier. Sur cette base, **Handley et Mithami (1984)** développent le labyrinthe en croix surélevée, exploitant la méfiance innée des rongeurs pour les espaces ouverts lors d'exploration d'un environnement nouveau. qui sera rapidement validé chez le rat (**Pellow et al., 1985**) puis chez la souris (**Lister., 1987**), comme un dispositif de mesure de l'anxiété chez les rongeurs. La validation du labyrinthe surélevé en tant que dispositif pour la mesure de l'anxiété chez les rongeurs est basée sur des critères comportementaux, physiologiques comme le taux de corticostérone (**File et al., 1994 ; Pellow et al., 1985 ; Rodgers et al., 1999**), et pharmacologiques (**Lister., 1987 ; Pellow et al., 1985**). C'est d'ailleurs l'efficacité des composés pharmacologiques, en particulier des benzodiazépines, qui ont conduit à l'utilisation du terme « anxiété » dans la littérature, au sujet de ce dispositif. Nous l'utiliserons donc également, mais comme nous l'avons déjà précisé, uniquement pour rendre compte de sorties comportementales liées à un conflit de mesure du risque et qui présentent des homologues avec l'expression humaine de l'anxiété (**Albrechet-Souza et al., 2007**).

Du fait de son utilisation très courante, le labyrinthe en croix surélevée présente pour avantage d'être largement décrit dans la littérature. Ainsi, sur le plan comportemental, un grand nombre de variables, classiques ou plus éthologiques, ont été décrites. Le principal intérêt de ces études est de montrer clairement des associations et des oppositions entre des variables ou des groupes de variables, que nous discuterons avec nos résultats. Malgré son utilisation très courante et son apparente simplicité, le labyrinthe en croix surélevée est un dispositif dont l'interprétation peut se révéler complexe et erronée si l'on ne tient pas compte des variables dans l'ensemble. Néanmoins, ce dispositif est actuellement le plus utilisé et il a été validé par un ensemble de données pharmacologiques, mais aussi éthologiques.

## b- Dispositif utilisé

Le dispositif est en forme de croix et élevé à une hauteur de 40 à 60 cm du sol. Il se compose d'une partie centrale (10 × 10 cm), de deux bras protégés ouverts sans parois (50 × 10 × 50 cm) qui s'opposent à deux autres bras, perpendiculaires aux précédents, fermés par des parois (Fig.5) Le test dure 5 minutes et débute lorsque le rat est placé au centre du labyrinthe, face à un bras ouvert. Cette procédure est celle employée initialement par **Pellow et al. (1985)**.

D'autres auteurs placent l'animal face à un bras fermé et ce sont des observations préliminaires qui nous amènent à choisir la première possibilité. En effet, dans nos conditions de test, le fait de placer des rats mâles face à un bras ouvert, augmente la latence de la première entrée dans un bras, mais également le nombre d'entrées dans les bras ouverts par la suite. Ainsi, nous nous sommes placés dans les conditions qui maximisent le nombre d'entrées dans les bras ouverts et compte tenu de l'aversion des rongeurs pour les espaces vides et la hauteur, les bras ouverts du dispositif sont plus anxiogènes que les bras fermés. Ainsi le principe du test repose sur le conflit d'approche/évitement des bras ouverts. Un animal qui explore les bras ouverts sera décrit comme étant «peu anxieux» et un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif, sera lui, décrit comme étant «anxieux».



**Figure 5** Dispositif du labyrinthe en croix surélevée

## c- Variables mesurées

Durant ce test, les variables mesurées sont : Temps au centre (Sec) ; Temps dans les bras ouverts (Sec) ; Temps dans les bras fermés (Sec); Entrées dans les bras ouverts; Entrées dans les bras fermés; Nombre total d'entrées dans les bras; Nombre de redressements; Nombre de prises d'information sur les profondeurs;

Nombre de postures d'attention étirée (SAPs). Deux types de variables sont relevés : des variables classiques (**Lister, 1987 ; Pellow et al., 1985**) et des variables plus éthologiques tirées du répertoire comportemental défensif des rongeurs (**Rodgers et Johnson, 1995**).

Parmi les variables classiques, nous avons mesuré le temps passé dans les différentes parties du dispositif, le nombre d'entrées dans les bras fermés et dans les bras ouverts, les premiers paramètres sont considérés comme un reflet de certaines caractéristiques de l'anxiété du Rat alors le nombre d'entrée dans les différentes branches est employé autant qu'indice de l'activité locomotrice

Parmi les variables éthologiques, nous avons mesuré le nombre de redressements. Le critère retenu pour l'entrée dans un bras ou dans son extrémité, est celui couramment utilisé dans la littérature, c'est-à-dire que les quatre pattes de l'animal doivent avoir pénétré dans le bras ou dans son extrémité. Le critère que nous avons retenu pour la sortie d'un bras ou de son extrémité (ce dernier n'étant pratiquement jamais cité dans la littérature) nécessite que l'animal sorte au moins deux pattes du bras ou de son extrémité

Avant chaque essai, le dispositif est précautionneusement nettoyé à l'aide d'éthanol à 20%, afin de supprimer toute trace dont la persistance d'odeurs qui pourraient perturber le comportement de l'animal suivant.

### **2.5.3.3. Procédure des champs ouverts (Open Field Test)**

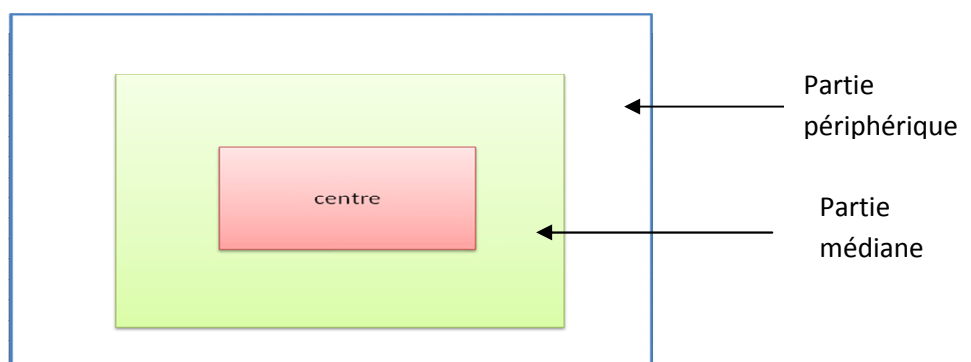
#### **a. Description du test**

Le test de l'Open Field, initialement décrit par **Hall (1934, 1938)**, a été développé dans le but de mesurer les différences de réactivité émotionnelle chez le rat et permettre ainsi d'observer l'anxiété non pathologique des animaux (**Prut, L. et Belzung, C., 2003**). Brièvement, le test consiste à placer l'animal dans une enceinte inconnue (Hall emploie les termes de strange ou unfamiliar) puis à observer son comportement et l'évolution de ce comportement au cours de plusieurs sessions d'exposition. Parmi les premières mesures reflétant la réactivité émotionnelle, **Hall (1934)** propose tout d'abord la fréquence des défécations et mictions au cours des différentes sessions. En effet, l'activation du système nerveux végétatif de l'animal conduit au déclenchement de ces réactions et Hall trouve de fortes corrélations négatives entre ces occurrences et le fait de

s'alimenter dans la situation de test, ce dernier comportement reflétant pour Hall une faible réactivité émotionnelle. Dans une seconde étude, **Hall (1938)** propose l'activité ambulatoire (ambulatory activity), en distance parcourue par unité de temps, comme mesure de la réactivité émotionnelle. Sur la base des travaux de Hall, et compte tenu de son aspect pratique, l'Open field a été très largement utilisé pour aborder la réactivité émotionnelle chez les rongeurs. Les mesures de Hall ont été appuyées par certains auteurs (**Denenberg., 1969**). et critiquées par d'autres (**Walsh et Cummins., 1976**). Les mesures de défécations et de mictions ont été très souvent critiquées, notamment parce qu'elles sont difficilement utilisables en pharmacologie (**Boissier et Simon., 1965**). De plus, l'utilisation d'un indice de locomotion comme indice de réactivité émotionnelle semble problématique, surtout au cours de la première session de test. En effet, des animaux peuvent montrer une locomotion élevée dans le but d'explorer le dispositif, ce qui témoignerait d'une faible réactivité émotionnelle, mais aussi dans le but de chercher un moyen d'échapper au dispositif, ce qui témoignerait au contraire, d'une forte réactivité émotionnelle. Malgré ces problèmes d'interprétation des données, l'Open Field test est toujours employé dans de nombreuses études comme test de mesure de la locomotion.

### **b. Dispositif utilisé**

L'activité locomotrice et l'activité exploratrice sont mesurées dans le test de l'Open Field. Il s'agit d'une enceinte en forme de carré profonde et ouverte en haut, fabriqué en plexiglace dont la hauteur est de 60 cm. Le dispositif est partagée en 3 zones : une périphérique 70X70 cm, une médiane : 50X50 cm et une centrale : 30X30 cm. (Fig. 6)



**Figure 6. Dispositif des champs ouverts**

Avant chaque test, le plancher est nettoyé à l'aide de l'éthanol à 20% afin de supprimer d'éventuels messages olfactifs du congénère précédent. Les rats sont déposés au centre de l'enceinte et laissés au calme pendant 5 min, toute l'opération est filmée.

### **c. Variables mesurées**

Différents paramètres sont mesurés lors de l'analyse des vidéos, afin d'évaluer l'indice de l'anxiété par le calcul de temps passé dans la partie centrale, le temps passé dans la partie médiane, le temps passé dans la partie périphérique, le nombre de cases traversées et le temps de redressement.

### **2.5.3.4. Procédure de Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water Maze Test)**

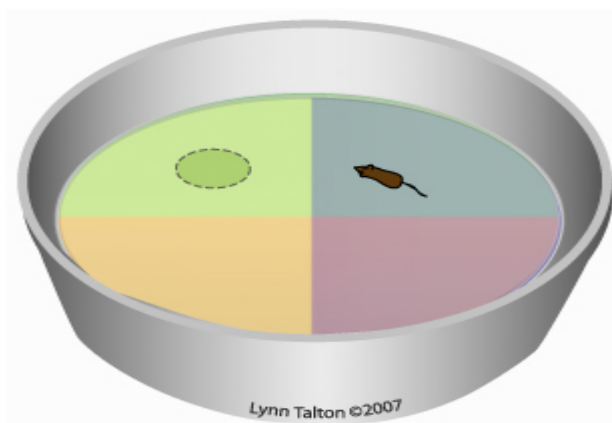
Ce test a été conçu par **Morris (1984)** pour évaluer les capacités à mémoriser et à gérer de l'information spatiale dans une situation peu agréable pour le rat. L'animal doit échapper à une situation aversive (l'eau froide) en se réfugiant sur une plate-forme invisible. Pour cela, il doit se forger et utiliser une représentation de son environnement en se basant sur les indices spatiaux disponibles. Cette représentation est dite allocentrique. La piscine de Morris est l'un des tests les plus utilisés, et de nombreux protocoles ont été développés pour évaluer différentes composantes de la mémoire (mémoire de référence, mémoire de travail), ou déceler les stratégies utilisées par les animaux pour se repérer dans l'espace (stratégie allocentrique ou égocentrique). Compte tenu des déficits lourds entraînés par le modèle de lésion choisi, nous avons utilisé une version simplifiée du test, la plate-forme étant maintenue au même endroit tout au long de l'expérience, et focalisé notre attention sur la mémoire spatiale de référence. La mémoire de référence se rapproche d'une mémoire à long terme dans laquelle seraient stockées des règles générales, des items dépendants du contexte, ou encore des procédures caractéristiques d'une situation donnée. Ces règles, items et procédures restent valables pour cette même situation toutes les fois où le rat y est confronté.

### **a. Dispositif expérimental**

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire métallique de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur,

remplie à mi-hauteur d'eau 22 à 32 ° C. L'eau est rendue opaque par adjonction de lait en poudre. La plate-forme, constituée d'un cylindre (11cm de diamètre) en plastique transparent, est immergée à 1cm sous la surface afin d'être invisible pour l'animal. (Fig 7)

La piscine est placée dans une pièce comportant différents indices distaux (étagères avec cages, tuyaux peints, ventilation, formes géométriques, etc.) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'enceinte et de mémoriser la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique. L'utilisation d'un repère visuel lors des tests permet à l'animal d'avoir un repère à l'intérieur du labyrinthe qui lui permet de s'orienter. La tâche du rat est d'apprendre à rejoindre la plate-forme le plus directement possible. Le trajet effectué par l'animal est filmé à l'aide d'une caméra vidéo.



**Figure 7 Dispositif du labyrinthe aquatique de Morris**

#### **b. Protocole et variables mesurés**

Le rat est déposé à l'opposé du quadrant cible et tente d'échapper à une situation aversive (l'eau froide) en se réfugiant sur une plate-forme invisible. Pour cela, il doit se forger et utiliser une représentation de son environnement en se basant sur les indices spatiaux disponibles. Nous avons utilisé une version simplifiée du test, la plateforme étant maintenue au même endroit tout au long de l'expérience. L'animal effectue cinq essais par jour durant quatre jours, chaque essai dure 60 s au maximum séparé par une lapse de temps de 30 s, le rongeur est



laissé sur le refuge le temps de 10 s. le dernier jour le rat effectue 3 essais avec plate-forme et deux essais sans plateforme. Toutes les expériences sont enregistrées sur vidéo.

La variable étudiée est le temps de latence émis par le rat pour retrouver la plateforme (en seconde).

## **2.5.4. Dosage des paramètres immunitaires**

### **2.5.4.1. Dosage des immunoglobulines**

Les IgG n'existent que sous forme de monomère et sont constituées de deux chaînes légères (kappa ou lambda) et de deux chaînes lourdes gamma. Les IgG représentent environ 80% des immunoglobulines sériques. Le rôle principal des IgG réside dans la défense de l'organisme contre les microorganismes, les IgG sont les seules immunoglobulines à pouvoir traverser la barrière placentaire et confèrent une immunité passive au fœtus et au nouveau-né.

Des taux élevés d'IgG polyclonales sont observés lors de maladies hépatiques chroniques (hépatite, cirrhose de Laennec), et en cas de lupus érythémateux systémique, de maladies infectieuses et de fibrose kystique. Des concentrations élevées d'IgG monoclonales se rencontrent dans les myélomes à IgG.

La synthèse des IgG est diminuée dans les syndromes d'immunodéficience congénitale et acquise et dans les déficits sélectifs en sous-classe d'IgG comme par exemple dans l'agammaglobulinémie (maladie de Bruton). Des faibles concentrations d'IgG se rencontrent dans les entéropathies avec perte protéidique.

L'addition de polyéthylène glycol (PEG), comme l'ont décrite Lizana et Hellsing, accroît la précipitation des complexes antigènes-anticorps et augmente la sensibilité du test.

#### **2.5.4.1.1. Principe de test**

Le test Roche IgG repose sur le principe d'agglutination immunologique (test immunoturbidimétrique). Les anticorps anti-IgG réagissent avec les IgG de l'échantillon avec formation de complexes antigènes-anticorps. L'agglutination qui en résulte est mesurée par turbidimétrie. L'addition de polyéthylène glycol permet d'atteindre rapidement le point final, augmente la sensibilité et diminue le risque

d'obtention de résultats faussement négatifs pour les échantillons présentant un excès d'antigène.

#### **2.5.4.1.2. Prélèvement et préparation des échantillons**

Pour le prélèvement et la préparation des échantillons, utiliser uniquement des tubes ou récipients de recueil appropriés. Seuls les types d'échantillons suivants ont été testés et peuvent être utilisés : Sérum, plasma recueilli sur héparinate de lithium, de sodium ou EDTA disodique/ tripotassique.

#### **2.5.4.1.3. Réactifs -Composition et concentrations**

R1 tampon TRIS : 20mmol/l, pH8.0 ; NaCl : 200mmol/l ; polyéthyléneglycol : 3.6% ; conservateur et stabilisateurs. R2 Anticorps (de chèvre) anti-IgG humain : dépend du titre de l'anti sérum ; tampon TRIS : 20mmol/l, pH8.0 NaCl : 150mmol/l ; conservateur.

#### **2.5.4.1.4. Conservation et stabilité**

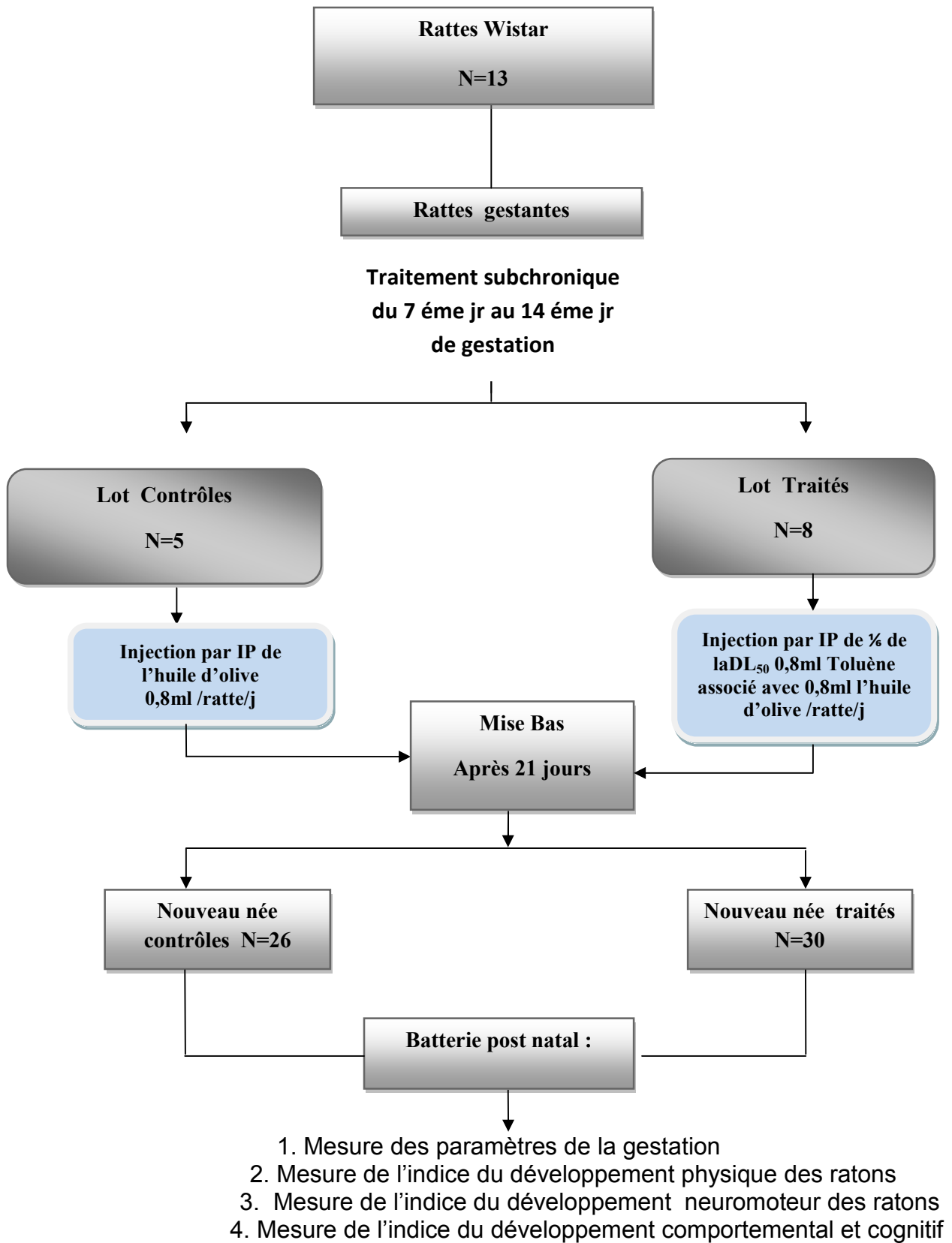
Les réactifs sont prêt à l'emploi, avant l'ouverture des flacons la conservation est entre 2et 8°C jusqu'à la date péremption indiquée, et 90 jours après l'ouverture et réfrigéré sur l'analyseur.

#### **2.5.4.1.5. Calcule de résultats**

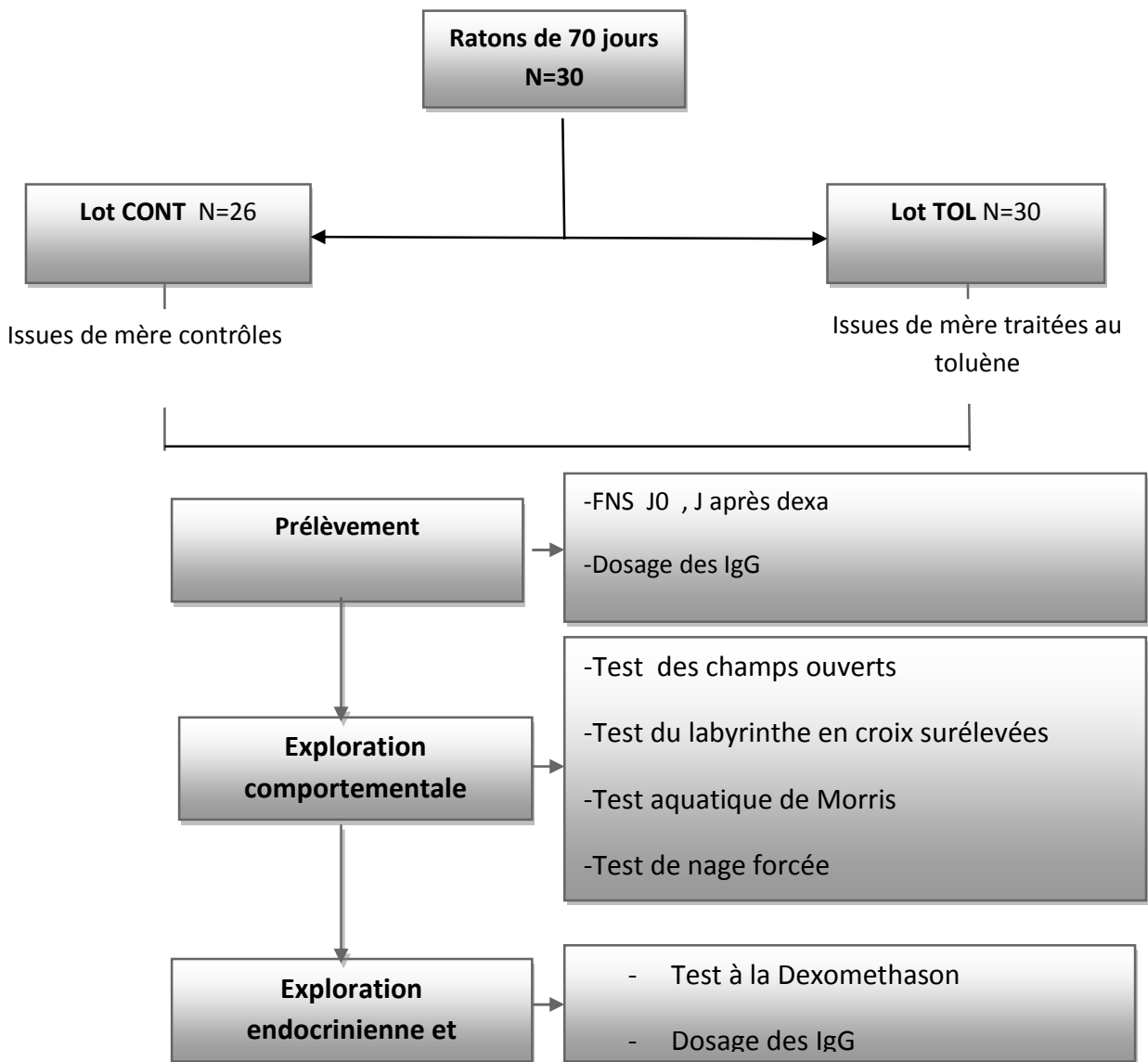
L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analyte de chaque échantillon. Facteurs de conversion :  $\text{mg/dl} \times 0.01 = \text{g/l}$ ,  $\text{g/l} \times 6.67 = \mu\text{mol/l}$ ,  $\text{g/l} \times 100 = \text{mg/dl}$ ,  $\text{mg/l} \times 6.67 = \text{nmol/l}$

#### **2.6. Analyse statistique :**

Toutes les données sont présentées en moyenne  $\pm$  ecartype. Le test de a été réalisé pour la batterie post-natale. ANOVA à un seul facteur a été utilisée pour évaluer les différences entre le lot Cont et Tol suivie par le test de Fisher (F)ou Student (t). tout les tests précédents ont été effectué grace au logiciel XLSTAT pro7.5



**Figure 8.** Protocole expérimental chez les nouveaux nés (partie 2)



**Figure 9** : protocole expérimental chez les adultes (partie 3)

### 3. Résultats

#### 3.1. Effet du traitement sur la taille de la portée et sex-ratio à la naissance

##### 3.1.1. Sex ratio des ratons

Le Tableau 04 fait apparaître les résultats en pourcentage pour le sex ratio des nouveaux nés. Ce paramètre indique la proportion de mâles dans la portée. Il ressort que le traitement prénatal au toluène modifie le sex ratio (Lot Cont :  $51,99 \pm 13,80$  vs Lot Tol :  $61,79 \pm 27,9$ ). Ce qui traduit une prédominance des mâles dans la portée.

**Tableau 04 : Sex ratio (%) des ratons**

<b>Lots</b>	<b>Lot Tol (N=30)</b>	<b>Lot Cont (N=26)</b>
<b>Sex ratio (%)</b> Test F de Fisher =4,087 P=0,406 ddl 1=3 ddl 2=2	$61,79 \pm 27,9$	$51,99 \pm 13,80$

##### 3.1.2. Taille des portées

La taille de la portée représente le nombre de petits nés par mise bas. Les résultats concernant ce paramètre sont consignés dans le tableau 5. Il ressort que le traitement prénatal au toluène provoque une baisse de la taille de la portée (Lot Cont :  $8,67 \pm 2,08$  vs Lot Tol :  $7,5 \pm 4,43$ ).

**Tableau 05 : Taille des portées issues de femelles traitées et contrôles**

<b>Lots</b>	<b>Lot Tol (N=30)</b>	<b>Lot Cont (N=26)</b>
<b>Taille de la portée</b> Test F de Fisher = 4,538 P= 0,372 ddl 1=3 ddl 2=2	$7,5 \pm 4,43$	$8,67 \pm 2,08$

### 3.2. Effets du traitement au toluène sur le développement physique des rats

#### 3.2.1. Evolution pondérale (J2 J5 J9 J12 J15 et J18)

Le tableau 6 rapporte l'évolution pondérale des rats issus de femelles ayant été exposées au toluène au cours de la gestation. Il ressort de ces résultats que la progéniture des mères traitées au toluène présente un déficit pondérale très marqué et ce durant la période allant de la naissance jusqu'au 18<sup>ème</sup> jour post-natal. Ainsi au PN2, le poids des rats, Lot Tol : 44.75 ± 28.61 vs Lot Cont : 61,33 ± 21,01, au PN9, Lot Tol : 89,00 ± 41,26 vs Lot Cont : 118,33 ± 48,95, au PN18, Lot Tol : 184,75 ± 44,21 vs Lot Cont : 200,67 ± 87,09.

**Tableau 06 : Évolutions pondérales des petits rats**

	PN2 (g)	PN5 (g)	PN9 (g)	PN12 (g)	PN15 (g)	PN18 (g)
Lot Tol	44,75 ±28,61	68,50 ±42,63	89,00 ±41,26	111,25 ± 48,11	165,50 ± 44,84	184,75 ± 44,21
Lot Cont	61,33 ±21,01	83,77 ± 35,60	118,33 ± 48,95	149,67 ± 56,50	175,67 ± 74,59	200,67 ± 87,09

#### 3.2.2. Age de percée d'incisive

Les résultats du Tableau 7 représente le pourcentage des rats chez lesquels on a observé la saillis des incisives au 8<sup>ème</sup> jour (PN8) et celui des rats chez lesquels on a observé la saillis des incisives au 9<sup>ème</sup> jour (PN9). Ces résultats montrent que l'exposition au toluène au cours de la gestation a provoqué chez la progéniture un retard d'un jour dans la percée des incisives chez 90% des sujets. Ainsi chez le Lot Cont 100 % des rats ont ouvert leurs yeux au 8<sup>ème</sup> jour, alors que chez le Lot Tol seulement 10 % des rats ont ouvert leurs yeux le 8<sup>ème</sup> jour (PN8) et 90 % le 9<sup>ème</sup> jour (PN9). Le Test de Kruskal-Wallis affirme la présence de différence significative parmi l'âge de percée d'incisives des jeunes mâles.

**Tableau 07: Age de sorties d'incisives des jeunes mâles**

Lot des rats	Mâle-Tol	Mâle-Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 23,000 P=&lt; 0,0001</b>	9,000 ± 0,000 ***	8,000 ± 0,000***

K.W : Kruskal-Wallis \*\*\* p≤0,001

Le Test de Kruskal-Wallis affirme la présence de différence significative parmi l'âge de percée des incisives des jeunes femelles (Tableau 8).

**Tableau 4 Age de sortie d'incisives des jeunes femelles**

Lot des rats	femelle-Tol	femelle-Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 31,000 P=&lt; 0,0001</b>	9,000 ± 0,000***	8,000 ± 0,000***

K.W : Kruskal-Wallis \*\*\* p≤0,001

### 3.2.3. Age d'ouverture des yeux

Les résultats du Tableau 09 représentent le pourcentage des ratons chez lesquels on a observé l'ouverture des yeux au 13<sup>eme</sup> jour (PN13) et celui des ratons chez lesquels on a observé l'ouverture des yeux au 14<sup>eme</sup> et au 15<sup>eme</sup> jour (PN14 et PN15). Le Test de Kruskal-Wallis confirme la présence d'hétérogénéité parmi l'âge d'ouverture des yeux des jeunes mâles. Ces résultats montrent que l'exposition au toluène au cours de la gestation a provoqué chez la progéniture un retard dans l'ouverture des yeux chez tous les sujets. Ainsi chez le Lot Cont 100 % des ratons ont ouvert leurs yeux au 13<sup>eme</sup> jour (PN13), alors que chez le Lot Tol 40 % des ratons ont ouvert leurs yeux le 14<sup>eme</sup> jour (PN14) et 60 % le 15<sup>eme</sup> jour (PN15).

**Tableau 09 Age d'ouvertures des yeux des jeunes mâles**

Lot des rats	mâle-Tol	mâle -Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 19,843 P=&lt; 0,0001</b>	14,538 ± 0,519***	13,000 ± 0,000***

K.W : Kruskal-Wallis \*\*\* p≤0,001

Le Test de Kruskal-Wallis confirme la présence d'hétérogénéité parmi l'âge d'ouverture des yeux des jeunes femelles.

**Tableau 10: Age d'ouverture des yeux des jeunes femelles**

Lot des rats	femelle-Tol	femelle -Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 27,253 P=&lt; 0,0001</b>	14,647 ± 0,493***	13,000 ± 0,000***

K.W : Kruskal-Wallis

\*\*\* p≤0,001

### 3.3. Effet du traitement au toluène sur le développement neuro-moteur des jeunes

#### 3.3.1. Test de retournement

La maturation neuromusculaire est mesurée par le temps de latence de retournement. Ces mesures sont indiquées dans le tableau 11 pour les ratons mâles et tableau 12 pour la progéniture femelle

De ces résultats il ressort que l'exposition prénatale au toluène provoque :

- Chez les ratons mâles issues des mères traitées au toluène un allongement du temps de latence de retournement, c'est-à-dire, Lot Tol : 31,50 ± 19,50 vs Lot Cont : 28,27±17,25. Quoique le test de Kruskal-Wallis ne montre pas d'hétérogénéité parmi les temps de latence de retournement des rats mâles, les tendances des variations nous laissent penser que les petits ratons provenant des mères traitées présentent un déficit marqué dans la maturation neuromusculaire.

**Tableau 11: le temps de latence de retournements des jeunes mâles**

Lot des rats	Mâle-Tol n=13	Mâle - Cont n=12
<b>KW : H (ddl=1)= 3,841 P=0,870</b>	29,308 ± 18,414	26,833 ±17,183

K.W = Kruskal-Wallis

- Chez la progéniture femelle cet allongement est moins marqué (Lot Tol : 28,11 ± 25,69 vs Lot Cont : 27,07 ± 19,81). Ceci suppose que la progéniture femelle ne semble pas présenter de déficit dans la maturation neuromusculaire suite à



une exposition prénatale au toluène. Le test de Kruskal-Wallis confirme l'absence d'hétérogénéité parmi les temps de latence de retournement des rats femelles.

**Tableau : 12 temps de latence de retournement des jeunes femelles**

Lot des rats	femelle- Cont	femelle -Tol
<b>KW H (ddl= 1)= 3,841 p=0,0246</b>	26,000 ± 20,248	35,294 ± 22,671

K.W = Kruskal-Wallis

### 3.3.2. Test d'agrippement

Le test d'agrippement mesure la force musculaire des membres antérieurs. Elle est appréciée à partir d'un angle de chute (plus l'angle est grand et plus la force musculaire est importante). Les mesures des angles de chutes sont représentées dans les tableaux 13 pour les rats mâles et tableaux 14 pour la progéniture femelle.

- Chez le mâle, la mesure de l'angle de chute révèle que l'exposition prénatale au toluène provoque une diminution significative démontrée par le test Kruskal-Wallis de l'angle de chute (Lot Tol : 61,00±18,04 vs Lot Cont : 75,00± 9,00). Cette diminution de l'angle de chute est révélatrice d'une perte de force musculaire suite à l'exposition au toluène.

**Tableau 13 : Angle de chute des jeunes mâles**

Lot des rats	Mâle - Tol	Mâle -Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 4,866 P=0,027</b>	60,000 ± 18,371*	75,000 ± 9,000*

K.W = Kruskal-Wallis

\* : p≤0,05

- Chez la femelle la diminution de l'angle de chute est plus importante (Lot Tol : 58,33±14,04 vs Lot Cont : 77,40± 8,17) révélant une perte plus importante de la force musculaire des membres antérieurs. Ainsi Le test de Kruskal-Wallis montre une différence significative entre les échantillons parmi les angles de chute des jeunes femelles.

**Tableau 14 : Angle de chut des jeunes femelles**

<b>Lot des rats</b>	<b>femelle-Tol</b>	<b>femelle-Cont</b>
<b>K.W : H (ddl=1)= 7,792 P=0,005</b>	63,588 ± 14,693*	77,400 ± 8,175*

K.W = Kruskal-Wallis \* :  $p \leq 0,05$

### 3.3.3. Test de réaction antigravitaire

Le test de réaction antigravitaire mesure la maturation du cervelet et des canaux semi-circulaire de l'oreille interne à travers la mesure du temps de réaction gravitaire (plus le temps est long et plus la maturation est déficiente). Les mesures des temps de réaction sont consignées dans le tableau 15 pour les ratons mâles et dans le tableau 16 pour la progéniture femelle.

- Chez le mâle, le temps de réaction est significativement allongé suite à l'exposition prénatale au toluène (Lot Tol : 41,43±28,64 vs Lot Cont : 9,91± 5,58). Le test de Kruskal-Wallis démontre cette divergence importante parmi jeunes mâles. Ceci dénote d'un retard sévère dans le développement du cervelet et des canaux semi-circulaires de l'oreille interne.

**Tableau 15 : Réaction antigravitaire des jeunes mâles**

<b>Lot des rats</b>	<b>mâle – Tol</b>	<b>mâle-Cont</b>
<b>K.W : H (ddl=1)= 15,334 P=&lt; 0,0001</b>	38,692 ± 17,988***	9,909 ± 5,576***

K.W = Kruskal-Wallis \*\*\* $\leq 0,001$

- Chez la progéniture femelle il est également signalé un allongement du temps de réaction (Lot Tol : 36,22±15,75 vs Lot Cont : 15,07±6,83). Le test de Kruskal-Wallis signale une différence significative. Ceci révèle un retard moins sévère, dans le développement du cervelet et des canaux semi-circulaires de l'oreille interne que chez les jeunes femelles.

**Tableau 16 : Réaction antigravitaire des jeunes femelles**

Lot des rats	Femelle -Tol	Femelle-Cont
<b>K.W : H (ddl=1)= 7,301 P=0,007</b>	31,059 ± 17,126**	15,067 ± 6,829**

K.W = Kruskal-Wallis      \*\*≤0,01

### 3.3.4. Test de suspension

Le test de suspension mesure la force musculaire et la fatigabilité des rats qui est appréciée à travers la durée de suspension. Les résultats sont exprimés dans les tableaux 17 et 18 respectivement pour les rats mâles et femelles.

- Chez le mâle, les résultats montrent une diminution considérable du temps de suspension, ce qui révèle une fatigabilité accrue et un affaiblissement musculaire chez les rats ayant subi une exposition prénatale au toluène. Le Test Kruskal-Wallis confirme une différence significative parmi le temps de suspensions des jeunes mâles.

**Tableau 17 : Durée de suspension des jeunes mâles**

Lot des rats	mâle-Tol	mâle -Cont
<b>KW : H (ddl=1)= 4,617 P=0,032</b>	24,077 ± 15,332*	13,364 ± 4,478*

K.W = Kruskal-Wallis

\* p≤0,05

- Chez la progéniture le test Kruskal-Wallis ne montre pas de distinction particulière parmi le temps de suspensions des jeunes femelles. Cela signifie que les femelles ayant subis une exposition prénatale au toluène ne présentent pas un affaiblissement musculaire durant le test de suspension.

**Tableau 18 : Durée de suspension des jeunes femelles**

Lot des rats	femelle-Cont	femelle-Tol
<b>KW : H (ddl=1)= 3,374 P=0,066</b>	16,200 ± 5,348	26,941 ± 18,498

K.W : Kruskal-Wallis

### 3.4. Effet sur le développement comportemental et cognitif des jeunes

#### 3.4.1. Test des champs ouverts

Le test des champs ouverts permet d'apprécier l'activité locomotrice (le nombre de cases traversées), exploratrice (nombre de redressements) et émotionnelle (anxiété) des ratons. Les résultats obtenus dans ce test sont représentés dans le tableau 19, pour les ratons mâles et le tableau 20 pour les femelles.

- Chez le raton mâle, le traitement prénatal au toluène fait augmenter tous les paramètres mesurés au niveau du test des champs ouverts, ainsi, le nombre de cases traversées (Lot Tol :  $195,44 \pm 54,24$  vs Lot Cont :  $142,37 \pm 87,58$ ), le nombre de redressements (Lot Tol :  $24,89 \pm 6,05$  vs Lot Cont :  $15,62 \pm 8,86$ ) et le nombre de passage dans le centre (Lot Tol :  $3,44 \pm 1,94$  vs Lot Cont :  $1,37 \pm 1,06$ ). Cette augmentation des paramètres du test des champs ouverts traduit le fait qu'une exposition prénatale au toluène a produit un effet anxiolytique chez les ratons. Le test de Kruskal-Wallis montre une divergence significative parmi le nombre de passage par le centre des jeunes mâles.

**Tableau 19 : Activité locomotrice, exploratrice et anxiété des jeunes mâles**

Les paramètres	Les tests	MÂLE Tol N=9	MÂLE Cont N=8
Nombre de cases traversées	K.W : H (ddl=1)= 1,122 P=0,290	$195,444 \pm 54,240$	$151,875 \pm 91,208$
Nombre de redressement	K.W : H (ddl=1)= 2,692 P=0,101	$24,889 \pm 6,051$	$17,375 \pm 10,028$
Nombre de passage par le centre	K.W : H (ddl=1)= 5,488 P=0,019	$3,444 \pm 1,944^*$	$1,250 \pm 1,165^*$

K.W : Kruskal-Wallis \*  $p \leq 0,05$

- Chez la femelle ce test révèle les mêmes constatations précédentes. Ainsi le test de Kruskal-Wallis ne signale aucune différence parmi l'activité locomotrice et l'activité exploratrice des jeunes femelles par contre le test montre une divergence significative parmi le nombre de passage par le centre des jeunes femelles.

**Tableau 20 : 5Activité locomotrice, exploratrice et anxiété des jeunes femelles**

<b>Paramètres</b>	<b>Tests</b>	<b>Femelle Tol n=8</b>	<b>femelle Cont n=6</b>
<b>Nombre de cases traversées</b>	K.W : H (ddl=1)= 0,417 P=0,519	206,000 ± 36,158	176,167 ± 63,499
<b>Nombre de redressement</b>	K.W : H (ddl=1)= 0,342 P=0,559	29,000 ± 3,295	26,500 ± 7,969
<b>Nombre de passage par le centre</b>	K.W : H (ddl=1)= 7,814 P=0,005	2,875 ± 0,835*	1,000 ± 0,894*

K.W : Kruskal-Wallis

\* p≤0,05

### 3.4.2. Test de Morris

Le test de Morris permet d'évaluer les capacités mémoratives des animaux à travers l'estimation du temps mis par l'animal pour retrouver la plateforme. Les résultats sont rapportés dans le tableau 21 pour les rats mâles et le tableau 22 pour la progéniture femelle.

-chez les mâles : Le test de K.W ne montre aucune hétérogénéité parmi la moyenne des essais 3, 4, 5 du premier jour de Morris test qui correspond au PN50 des jeunes mâles. Même constat pour les résultats du temps de latence consommé par le rat pour atteindre la plateforme durant le premier et second essai du PN51. Le test de Friedman confirme l'absence de variabilité du temps de latence pour les trois essais du 1<sup>er</sup> jour. Le test de Wilcoxon ne révèle aucun changement significatif pour les deux Lots : Tol et Cont. Donc les capacités mémoratives des mâles ayant subis une exposition prénatale n'est pas affectée.

**Tableau 21 Temps de latence pour se réfugier sur la plate forme des jeunes mâles**

<b>Lot des rats</b>	<b>Mâle Tol n=9</b>	<b>Mâle Cont n=8</b>
<b>Moyenne des essais 3, 4, 5 (PN50) K.W : H (ddl=1)= 2,083 P=0,149</b>	20,185 ± 11,825	31,417 ± 14,387
<b>Test de Friedman Q (ddl=2) Essais 3, 4, 5.</b>	Q =2,457 P=0,293	Q = 2,571 P=0,276
<b>Moyenne des essais 1,2 (PN51) K.W : H (ddl=1)= 1,824 P=0,177</b>	35,556 ± 21,867	22,500 ± 12,036
<b>Test de Wilcoxon Z (E3 vs E5)</b>	Z=0,840 P=0,800	Z=1,524 P=0,128
<b>Test de Wilcoxon Z (E3, 4,5 vs E 1,2)</b>	Z=1,540 P=0,123	Z=1,183 P=0,237

K.W = Kruskal-Wallis

Chez les femelles : Le test de K.W ne montre aucune hétérogénéité parmi la moyenne des essais 3, 4, 5 du premier jour de Morris test qui correspond au PN50 parmi les jeunes femelles, même observation pour les résultats du temps de latence durant le premier et second essai du PN51. Le test de Friedman ne signale aucune divergence parmi le temps émis par le rat pour atteindre le refuge des jeunes mâles des deux lots. Le test de Wilcoxon ne démontre aucune différence du temps de latence entre les essais des deux jours.

**Tableau 22 Temps de latence pour se réfugier sur la plateforme des jeunes femelles**

<b>Les lots de rats</b>	<b>femelle Tol N=8</b>	<b>femelle Cont N=8</b>
<b>Moyenne des essais 3, 4, 5 (PN50)</b> K.W : H (ddl=1)= 0,398 P=0,528	22,500 ± 15,922	26,875 ± 13,124
<b>Test de Friedman : Q (ddl=2) Essais 3 ,4 ,5.</b>	Q = 5,556 P= 0,062	Q = 2,000 P=0,368
<b>Moyenne des essais 1,2 (PN51)</b> K.W : H (ddl=1)= 0,044 P=0,834	28,063 ± 12,715	25,313 ± 14,175
<b>Test de Wilcoxon Z (E3 vs E5)</b>	Z= 1,693  P= 0,955	Z=0,840  P= 0,800
<b>Test de Wilcoxon (E3,4,5 vs E1,2)</b>	Z=0,338 P=0,735	Z=0,676 P=0,499

K.W = Kruskal-Wallis

### **3.5. Résultats des tests comportementaux chez les rats à l'âge adulte (70 jours).**

#### **3.5.1. Effets du stress prénatal au toluène sur le comportement des rats dans le Test des champs ouverts à l'âge adulte**

Ce test utilisé pour tester l'anxiété, l'activité exploratrice et l'indice de locomotion des rats, les résultats constatés sont regroupés dans le tableau 23 pour les rats mâles et le tableau 24 concernant les rats femelles.

- Chez les mâles, Il existe bien une différence significative parmi le temps passé dans la partie médiane du dispositif. Ainsi le Lot Tol 14,222±13,553 vs Lot Cont 11,286±4,348. Les rats mâles ayant subi le stress prénatal se révèlent moins craintif à l'âge adulte.

**Tableau 23 : Activité locomotrice, activité exploratrice et indice d'anxiété dans le test d'open Field dans la population rat mâle**

<b>Lots des Rats</b>	<b>Lot Tol (N=9)</b>	<b>Lot Cont (N=7)</b>
<b>Temps passé dan la partie centrale</b> Test F de Fisher P=0,671 dd1=6 dd2= 8	4,444 ± 4,799	4,714 ± 5,589
<b>Temps passé dans la partie médiane</b> Test F de Fisher P=0,012 ddl1=8 ddl2=6	14,222 ± 13,553**	11,286 ± 4,348**
<b>Temps passé dans la partie périphérique</b> Test F de Fischer P=0,167 ddl1=6 ddl2=8	281,222 ± 16,657	284,000 ± 9,220
<b>Nombre de cases traversées</b> Test de F P=0,446, ddl1=6 ddl2=8	110,222 ± 58,354	125,429 ± 77,593
<b>Temps de redressement</b> Test F de Fischer P=0,660 ddl1=6 ddl2=8	22,222 ± 13,017	23,571 ± 15,252

\*\* p≤0,01

-Chez les femelles, on constate une différence très significative parmi le temps passé dans la zone périphérique du dispositif tel que le Lot Tol 304,375±37,263 vs 289,000±5,774. Cela suggère que le stress prénatal au toluène affecte le comportement émotionnel des femelles à l'âge adulte .



**Tableau 24 : Activité locomotrice, activité exploratrice et indice d'anxiété dans le test d'open Field dans la population rat femelle**

<b>Lots des rats</b>	<b>Lot Tol (N=8)</b>	<b>Lot Cont (N=4)</b>
<b>Temps passé dans la partie centrale (sec)</b> Test F de Fisher : p=0,105 ddl1=7 ddl2=3	2,000 ± 1,690	2,500 ± 0,577
<b>Temps passé dans la zone médiane (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,947 ddl1=7 ddl2= 3	6,125 ± 5,540	11,000 ± 5,354
<b>Temps passé dans la zone périphérique (sec)</b> Test F de Fisher P=0,011 ddl1=7 ddl2=3	304,375 ± 37,263**	289,000 ± 5,774**
<b>Temps de redressement (sec)</b> Test F de Fisher P= 0,688 ddl1=7 ddl2=3	24,875 ± 14,613	15,500 ± 10,970
<b>Nombre de cases traversées</b> Test F de Fisher P= 0,160 ddl1=7 ddl2=3	139,375 ± 64,946	61,500 ± 25,981

\*\* p≤0,01

### **3.5.2. Effets du stress prénatal au toluène sur le comportement des rats dans le Test du labyrinthe en croix surélevée à l'âge adulte**

Le test était réalisé dans le but d'évaluer le niveau d'anxiété des animaux. Les données enregistrées sont consignées dans les tableaux 25 pour les mâles adultes et le tableau 26 pour les rats femelles.

Chez les mâles, on observe une différence hautement significative du temps passé dans les bras ouverts (Lot Tol: 45,429±Lot Cont: 42,272 vs 37,714±12,038) donc les rats mâle du Lot Tol sont peu anxieux comparé au Lot Cont. Il semblerait que les rats mâles issus de mères traitées au toluène sont moins méfiant pour les espaces ouverts.

**Tableau 25 : Le niveau d'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée entre les mâles adultes.**

<b>Lots des rats</b>	<b>Lot Toluène (N= 7)</b>	<b>Lot Cont (N= 7)</b>
<b>Nombre de passage par le centre</b> Test F de Fisher : P= 0,865 ddl1=6 ddl2=6	11,429 ± 2,878	6,714 ± 3,094
<b>Nombre d'entrée dans les bras fermés</b> Test F de Fisher : P=0,168 ddl1=6 ddl2=6	8,143 ± 3,288	4,286 ± 1,799
<b>Nombre d'entrée dans les bras ouverts</b> Test F de Fisher : P=0,153 ddl1=6 ddl2=6	5,857 ± 3,532	4,286 ± 1,890
<b>Temps passé dans le centre (sec)</b> Test F de Fisher : P= 0,860 ddl1=6 ddl2=6	46,571 ± 24,241	25,571 ± 22,493
<b>Temps passé dans les bras fermés (sec)</b> Test F de Fisher : P= 0,602 ddl1=6 ddl2=6	208,000 ± 36,977	236,714 ± 29,596
<b>Temps passé dans les bras ouverts (sec)</b> Test F de Fisher : P= 0,008 ddl1=6 ddl2=6	45,429 ± 42,272**	37,714 ± 12,038**
<b>Nombre de redressement</b> Test F de Fisher : P= 0,093 ddl1=6 ddl2=6	10,429 ± 3,409	7,429 ± 1,618

\*\* p≤0,01

-Chez les femelles, on remarque une hausse dans tout les paramètres mesurés sur ce test mais le test de Fisher ne révèle aucune divergence significative parmi les femelles des deux lots (lot Toluène et control). Donc les femelles issues de mères traitées au toluène présentent un niveau d'anxiété très bas à l'âge adulte

**Tableau 26: Le degré d'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée entre les femelles**

<b>Lots des rats</b>	<b>Lot Tol (N=6)</b>	<b>Lot Cont (N=4)</b>
<b>Nombre de passage par le centre</b> Test F de Fisher : P=0,263 ddl1=5 ddl2=3	10,333 ± 5,922	6,250 ± 2,872
<b>Nombre d'entrée dans les bras fermés</b> Test F de Fisher : P=0,201 ddl1=5 ddl2=3	6,167 ± 3,251	4,000 ± 1,414
<b>Nombre d'entrée dans les bras ouverts</b> Test F de Fisher : P=0,201 ddl1=5 ddl2=3	6,167 ± 3,251	4,000 ± 1,414
<b>Temps passé dans le centre (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,431 ddl1=5 ddl2=3	23,500 ± 13,202	13,750 ± 7,932
<b>Temps passé dans les bras fermés (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,208 ddl1=5 ddl2=3	149,000 ± 48,361	250,750 ± 21,329
<b>Temps passé dans les bras ouverts (sec)</b> Test F de Fisher : P= 0,509 ddl1=5 ddl2=3	127,500 ± 49,585	60,500 ± 67,540
<b>Nombre de redressement (fois)</b> Test F de Fisher : P= 0,840 ddl1=3 ddl2=5	12,000 ± 3,950	10,500 ± 4,203

### **3.5.3. L'effet du stress prénatal au toluène sur les résultats de la nage forcée à l'âge adulte (70 jours)**

Ce test permet de mesurer le degré d'état de « dépression » ou plus précisément de l'état de résignation ou de motivation de l'animal. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 27 pour les rats femelles et 28 concernant les mâles.

Chez les femelles, on remarque une différence dans les paramètres mesurés. Ainsi le temps d'escalade est plus important pour le femelle Tol que les femelle Cont (Lot Tol 109,333±35,719 vs Lot Cont 101,500±33,234) ; le temps de nage dure plus longtemps chez les femelles Tol comparé aux femelles Cont (respectivement 125,667±39,561 vs 93,500± 55,861) et le temps d'immobilité

chez les femelle Tol est nettement inferieur à celui observé chez les femelles Cont. Néanmoins le test de Fisher ne montre aucune différence significative dans les paramètres de la nage forcée entre les femelle des deux lots (lot Toluène et control). Donc les femelles issues de mères traitées au toluène montre plus de motivation dans le test de nage forcée.

**Tableau 27: Le temps d'escalade, de nage et d'immobilité pendant le test de nage forcée parmi les femelles**

<b>Lots des rats</b>	<b>Lot Tol (N=6)</b>	<b>Lot Cont (N=2)</b>
<b>Temps d'escalade (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,790 ddl1=5 ddl2=1	109,333 ± 35,719	101,500 ± 33,234
<b>Temps de nage (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,434 ddl1= 1 ddl2=5	125,667 ± 39,561	93,500 ± 55,861
<b>Temps d'immobilité (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,792 ddl1=5 ddl2=1	65,167 ± 40,907	105,000 ± 22,627

Chez les mâles, on remarque que le temps d'escalade chez le Lot Tol est plus élevé que chez le Lot Cont (Tol 133,571± 28,664 vs Lot Cont 104,143 ± 28,204). Alors que pour le temps de nage et d'immobilité sont plus diminuer comparés à ceux trouver chez le Lot Cont (tableau 26). Cela suggère que les mâles issus de mères traitées au toluène sont moins déprimés à l'âge adulte au cours du test de nage forcée.

**Tableau 28 : Le temps d'escalade, de nage et d'immobilité pendant le test de nage forcée parmi les mâles**

<b>Lots des rats</b>	<b>Lot Tol (N=7)</b>	<b>Lot Cont (N=7)</b>
<b>Temps d'escalade (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,970    ddl1=6    ddl2=6	133,571 ± 28,664	104,143 ± 28,204
<b>Temps de nage (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,915    ddl1=6    ddl2=6	99,429 ± 27,159	115,571 ± 28,425
<b>Temps d'immobilité (sec)</b> Test F de Fisher : P=0,460    ddl1=6    ddl2=6	67,000 ± 43,105	80,143 ± 31,398

### 3.6. Résultats des paramètres immunologiques chez les ratons à l'âge adulte (70 jours).

#### 3.6.1. Variations des populations leucocytaires et des immunoglobulines G chez les rats mâles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène

**Tableau 29 : Paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours)**

Paramètre immunitaire	IGg 10 <sup>3</sup> /µl	GB 10 <sup>3</sup> /µl	Neut 10 <sup>3</sup> /µl	Lymph 10 <sup>3</sup> /µl	Mono 10 <sup>3</sup> /µl	Eos 10 <sup>3</sup> /µl	PLQ 10 <sup>3</sup> /µl
<b>Lot Tol</b>	1,7266 ± 0,2196	2,68 ± 1,59	1,562 ± 0,824	4,981 ± 1,124	0,0475 ± 0,0433	0,0575 ± 0,0437	764,1 ± 100,2
<b>Lot Cont</b>	2,005 ± 0,318	7,585 ± 2,621	1,316 ± 0,270	6,171 ± 2,48	0,0780 ± 0,0748	0,06 ± 0,0224	771,3 ± 101,4
<b>Test t Student</b>	1,532 α=0,002	-1,228 α=0,002	-0,851 α=0,002	1,252 α=0,002	1,021 α=0,002	0,151 α=0,002	0,150 α=0,002

Nous avons constaté une diminution significative du taux des globules blanc (Contrôle: 7,585±2,621 vs Tol : 2,68±1,59), des Immunoglobulines (Contrôle: 2,005±0,318vs Tol : 2,005±0,318), des lymphocytes (Contrôle: 6,171±2,48 vs Tol : 4,981±1,124), des monocytes (Contrôle: 0,0780±0,0748vs Tol : 0,0475±0,0433), des éosinophiles (Contrôle: 0,06±0,0224vs Tol : 0,0575±0,0437) et des plaquettes (Contrôle: 771,3±101,4vs Tol : 764,1±100,2) chez les rats mâles adultes (70 jours) issus des mères traités au toluènes par rapport à leurs équivalents issus des mères contrôles. Par contre nous avons noté une légère augmentation du taux des neutrophiles (Contrôle: 1,316 ± 0,270vs Tol : 1,562 ± 0,824).

### 3.6.2. Variations des populations leucocytaires et des immunoglobulines G chez les rattes femelles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène

**Tableau 30: Paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours)**

Paramètres immunitaires	IGg 10 <sup>3</sup> /µl	GB 10 <sup>3</sup> /µl	Neut 10 <sup>3</sup> /µl	Lymph 10 <sup>3</sup> /µl	Mono 10 <sup>3</sup> /µl	Eos 10 <sup>3</sup> /µl	PLQ 10 <sup>3</sup> /µl
<b>Lot Tol</b>	2,4 ± 0,4552	5,33 ± 2,499	1,517 ± 0,502	4,564 ± 1,986	0,100 ± 0,095	0,080 ± 0,067	771,3 ± 460,6
<b>Lot Cont</b>	2,3142 ± 0,725	8,307 ± 2,064	1,46 ± 0,393	6,404 ± 1,404	0,0114 ± 0,0107	0,0614 ± 0,0167	728,7 ± 67,4
<b>Test t Student</b>	-0,210 α= 0,002	2,423 α= 0,002	-0,1933 α= 0,002	1,691 α= 0,002	-2,504 α= 0,002	-0,719 α= 0,002	-0,382 α= 0,002

Nous avons constaté une diminution significative du taux des globules blanc (Cont: 8,307±2,064 vs Tol : 5,33±2,499), des lymphocytes (Cont: 6,404±1,404 vs Tol : 4,564±1,986), des monocytes (Cont: 0,0114±0,0107 vs Tol : 0,100±0,095) chez les rattes femelles adultes (70 jours) issues des mères traités au toluène par rapport à leurs équivalents issus des mères contrôles. A l'inverse, les autres paramètres accusent une augmentation: des éosinophiles (Cont: 0,0614±0,0167 vs Tol : 0,080±0,067) et les plaquettes (Cont: 728,7±67,4 vs Tol : 771,3±460,6), les neutrophiles (Cont: 1,46±0,393 vs Tol : 1,517±0,502) et des Immunoglobulines (Cont: 2,3142±0,725 vs Tol : 2,4± 0,4552).

### 3.6.3. Variations des paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours) issus des mères contrôles et traitées au toluène après traitement à la dexaméthasone

**Tableau 31: Paramètres immunitaires chez les rats mâles adultes (70jours) après traitement à la dexaméthasone.**

	GB 10 <sup>3</sup> /µl	Neut 10 <sup>3</sup> /µl	Lymph 10 <sup>3</sup> /µl	Mono 10 <sup>3</sup> /µl	Eos 10 <sup>3</sup> /µl	PLQ 10 <sup>3</sup> /µl
<b>Lot Cont</b>	7,585	1,316	6,171	0,0780	0,06	771,3
<b>Avt Dex</b>	±	±	±	±	±	±
	2,621	0,270	2,48	0,0748	0,0224	101,4
<b>Lot Cont</b>	2,308	1,72	1,0367	0,010	0,02	514,5
<b>Apr Dex</b>	±	±	±	±	±	±
	1,058	0,00	0,6559	0,017	0,014	272,8
<b>Lot Tol</b>	2,68	1,562	4,981	0,0475	0,0575	764,1
<b>Avt Dex</b>	±	±	±	±	±	±
	1,59	0,824	1,124	0,0433	0,0437	100,2
<b>Lot Tol</b>	5,066	2,41	2,785	0,05	0,0175	696,8
<b>Apr Dex</b>	±	±	±	±	±	±
	1,074	0,00	1,0536	0,047	0,015	191,7

Nous avons observé que la dexaméthasone engendre une diminution significative du taux des globules blancs (Cont Avt Dex 7,585 ± 2,621 Vs Cont Apr Dex : 2,308 ± 1,058 ), des lymphocytes (Cont Avt Dex 6,171 ± 2,48 Vs Cont Apr Dex 1,0367 ± 0,6559), des monocytes (Cont Avt Dex 0,0780 ± 0,0748 Vs Cont Apr Dex 0,010 ± 0,017), des éosinophiles (Cont Avt Dex 0,06 ± 0,0224 Vs Cont Apr Dex 0,02 ± 0,014) et des plaquettes (Cont Avt Dex 771,3 ± 101,4 Vs Cont Apr Dex 514,5 ± 272,8) chez les rats mâles adultes issus des mères non traitées au toluène. A l'inverse, les neutrophiles augmentent (Cont Avt Dex 1,316±0,270Vs Cont Apr Dex 1,72±0,00).

Par contre, chez les rats mâles adultes (70 jours) issus des mères traitées au toluène, la dexaméthasone agit différemment vis à vis des globules blancs (Tol Avt



Dex  $2,68 \pm 1,59$  Vs Tol Apr Dex  $5,066 \pm 1,074$ ) et des monocytes (Tol Avt Dex  $0,0475 \pm 1,124$  Vs Tol Apr Dex  $0,05 \pm 0,047$ ). Pour les autres paramètres, les variations vont de paire où nous avons constaté les taux des lymphocytes (Tol Avt Dex  $4,981 \pm 1,124$  Vs Tol Apr Dex  $2,785 \pm 1,0536$ ), des éosinophiles (Tol Avt Dex  $0,0575 \pm 0,0437$  Vs Tol Apr Dex  $0,0175 \pm 0,015$ ) et des plaquettes (Tol Avt Dex  $764,1 \pm 100,2$  Vs Tol Apr Dex  $696,8 \pm 191,7$ ) diminuent après traitement à la dexaméthasone, alors que le taux des neutrophiles (Tol Avt Dex  $1,562 \pm 0,824$  Vs Tol Apr Dex  $2,41 \pm 0,00$ ) augmente.

### 3.6.4. Variations des paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours) issues des mères contrôles et traitées au toluène après traitement à la dexaméthasone

**Tableau 32: Paramètres immunitaires chez les rattes femelles adultes (70jours) après traitement à la dexaméthasone.**

	GB $10^3/\mu\text{l}$	Neut $10^3/\mu\text{l}$	Lymph $10^3/\mu\text{l}$	Mono $10^3/\mu\text{l}$	Eos $10^3/\mu\text{l}$	PLQ $10^3/\mu\text{l}$
<b>Lot Cont</b> Avt Dex	8,307 $\pm$ 2,064	1,46 $\pm$ 0,393	6,404 $\pm$ 1,404	0,0114 $\pm$ 0,0107	0,0614 $\pm$ 0,0167	728,7 $\pm$ 67,4
<b>Lot Cont</b> Apr Dex	2,065 $\pm$ 0,983	1,754 $\pm$ 0,320	1,538 $\pm$ 0,052	0,100 $\pm$ 0,095	0,080 $\pm$ 0,067	771,3 $\pm$ 460,6
<b>Lot Tol</b> Avt Dex	5,33 $\pm$ 2,499	1,517 $\pm$ 0,502	4,564 $\pm$ 1,986	0,100 $\pm$ 0,095	0,080 $\pm$ 0,067	771,3 $\pm$ 460,6
<b>Lot Tol</b> Apr Dex	3,046 $\pm$ 0,948	1,6600 $\pm$ 0,1249	1,3650 $\pm$ 0,2111	0,032 $\pm$ 0,030	0,01800 $\pm$ 0,03493	853,2 $\pm$ 121,9

Nous avons remarqué que la dexaméthasone a provoqué une diminution significatif du taux des globules blancs (Cont Avt Dex:  $8,307 \pm 2,064$  Vs Cont Apr Dex:  $2,065 \pm 0,983$ ), des monocytes (Cont Avt Dex  $0,0114 \pm 0,0107$  Vs Cont Apr Dex  $0,100 \pm 0,095$ ) et des lymphocytes (Cont Avt Dex  $6,404 \pm 1,404$  Vs Cont Apr Dex  $1,538 \pm 0,052$ ) chez les animaux femelles issues des mères non traitées au toluène par rapport à celui des animaux issus des mères traitées au toluène. Les autres paramètres subissent une augmentation significative: des neutrophiles (Cont Avt Dex  $1,46 \pm 0,393$  Vs Cont Apr Dex  $1,754 \pm 0,320$ ), des éosinophiles (Cont Avt Dex  $0,0614 \pm 0,0167$  Vs Cont Apr Dex  $0,080 \pm 0,067$ ) et des plaquettes (Cont Avt Dex  $728,7 \pm 67,4$  Vs Cont Apr Dex  $771,3 \pm 460,6$ ).

Chez les rattes adultes femelles issue des mères traitées au toluène nous avons remarqué que la dexaméthasone a agit de la même manière, c.à.d. une diminution significatif du taux des globules blancs (Tol Avt Dex:  $5,33 \pm 2,499$  Vs Tol Apr Dex:  $3,046 \pm 0,948$ ), des monocytes (Tol Avt Dex  $0,100 \pm 0,095$  Vs Tol Apr Dex  $0,032 \pm 0,030$ ) et des lymphocytes (Tol Avt Dex  $4,564 \pm 1,986$  Vs Tol Apr Dex  $1,3650 \pm 0,2111$ ) chez les animaux femelles issues des mères non traitées au toluène par rapport à celui des animaux issus des mères traitées au toluène. Les autres paramètres subissent également une augmentation significative: des neutrophiles (Tol Avt Dex  $1,517 \pm 0,502$  Vs Tol Apr Dex  $1,660 \pm 0,1249$ ), des éosinophiles (Tol Avt Dex  $0,080 \pm 0,067$  Vs Tol Apr Dex  $0,01800 \pm 0,03493$ ) et des plaquettes (Tol Avt Dex  $771,3 \pm 460,6$  Vs Tol Apr Dex  $853,2 \pm 121,9$ ).

#### 4. Discussion

Dans notre étude, le traitement prénatal au toluène a provoqué un retard de développement très marqué sur la progéniture. Ce dernier est à considérer sous ses deux aspects, à savoir physique et neuromoteur.

Sur le plan physique, nos résultats concernant l'évolution pondérale (tableau 06) font tous apparaître une diminution du poids chez les petits issus des mères traitées par rapport à leurs homologues issus des mères non traitées. Nous rappelons que le traitement au toluène a été effectué chez les rattes à une dose correspondant au 1/10 de la DL<sub>50</sub> par voie intra péritonéale et pendant la période du 7<sup>ème</sup> jour au 14<sup>ème</sup> jour de gestation.

Ce retard de développement pondéral a été rapporté par plusieurs auteurs, parmi lesquels **Roberts et al. (1997)** et **Da-silva et al. (1990)** qui rapportent que les variations pondérales par voie d'inhalation sont dose dépendantes. Les malformations squelettiques et les effets sur le poids corporel des rats ne sont observés qu'avec des doses comprises entre 1500 et 3000 ppm (**A.P.I., 1978 ; Ono et al., 1995 ; T'atrai et al., 1980**). Dans cette étude, il ressort que l'exposition prénatale au toluène provoque une modification du métabolisme chez les jeunes, ainsi que dans la composition corporelle. Le toluène paraît provoquer une altération dans la consommation alimentaire (**Patricia et al., 2007**).

Dans notre travail, le déficit pondéral des rats issus des femelles traitées au toluène est souvent associé à un retard de la durée de l'éruption des incisives (Tableau 07, Tableau 08) et de l'ouverture des yeux (Tableau 09, Tableau 10). Ceci a été rapporté dans divers travaux qui signalent tous un retard dans la durée d'ouverture des yeux et de l'éruption des incisives (**Karin et al., 1998 ; Bharati et al., 2012 ; Thiel et al., 1997**).

Un autre résultat qui mérite d'être signalé, qui concerne le sex ratio et la taille de la portée. De nos résultats, il ressort que le traitement prénatal au toluène provoque une diminution de nombre de petits par portée (tableau 05) associé à une modification du sex ratio (tableau 04) où le nombre de nouveau nés mâles augmente dans la portée. Ce résultat est confirmé par plusieurs auteurs (**Karin et al., 2004 ; Scott et al., 2004, 2006 ; Bowen et al., 2005**). En ce qui concerne le

sex ratio, nos résultats ne sont pas confirmés par ces auteurs, et nous pensons que cette différence réside dans le mode de traitement.

Pour apprécier l'altération du système nerveux central (SNC) subi par la progéniture suite à une exposition des mères au toluène au cours de la gestation, notre travail s'est basé sur la mesure d'un certain nombre paramètres neuromoteurs, réalisée à partir d'une batterie de tests : Test de retournement (tableau 11, tableau 12), Test d'agrippement (tableau 13, tableau 14), Test de réaction antigravitaire (tableau 15, tableau 16) et Test de suspension (tableau 17, tableau 18). L'ensemble de nos résultats montre que les rats issus des femelles traitées au toluène présentent un déficit pour tous les tests, à l'exception du test de suspension. Ces déficits neuromoteurs seraient la conséquence d'altération de la structure nerveuse subie au cours du développement. Ces altérations supposées vont se traduire plus tard par des troubles neuromoteurs et comportementaux divers: Test des champs ouverts (tableau 23, tableau 24), test de labyrinthe en croix surélevée (tableau 25, tableau 26) et test de la nage forcée (tableau 27, tableau 28). A travers ces résultats, nous avons conclu que les animaux issus des mères traitées au toluène sont moins anxieux que leurs homologues issus des mères contrôles (tableau 23, tableau 24). En plus, au sein du groupe issu des mères traitées, la progéniture femelle adulte (70 jours) est moins anxieuse que la progéniture mâle adulte (70 jours). Cela suggère que le stress prénatal au toluène affecte plus le comportement émotionnel des femelles à l'âge adulte (70 jours). Le même constat a été signalé au niveau du test de labyrinthe en croix surélevée (tableau 25, tableau 26). Au niveau du test de la nage forcée (tableau 27, tableau 28), il paraît que l'antidépresseur clonazepam est plus efficace chez les animaux issus des mères traitées, cette efficacité est plus importantes chez les femelles adultes (70 jours).

Une multitude de travaux, réalisés dans ce contexte, rapportent tous que l'exposition prénatale au toluène provoque une baisse du poids du cerveau chez les nouveau nés (**Hass et al., 1994**). **Sidney et al. (1998)** et **Balster (1998)** trouvent que le toluène peut franchir la barrière hémato céphalique et provoquer des effets euphorisants comme les benzodiazépines. **Deleu et al. (2000)** et **Kamran et al (1998)**, rapportent que le toluène provoque une atrophie du cerveau ainsi qu'une atrophie de l'hippocampe. **Mzia et al. (2011)**, dans une étude relative

à une exposition postnatale, trouve que le toluène modifie la structure de l'hippocampe et provoque une perte des cellules pyramidales. Ces altérations du système nerveux suite au traitement au toluène en pré et postnatale, vont provoquer des modifications importantes dans le développement futur des petits. Ces modifications vont concerner principalement l'activité locomotrice et les facultés cognitives de l'animal. Dans ce contexte **Hass et al. (1994)** trouvent, lors d'une exposition prénatale au xylène, une baisse des capacités dans les tests de comportement neuromoteurs. Dans le même ordre d'idée **Karin et al. (1998)**, travaillant sur une exposition prénatale au toluène, ne trouvent pas d'effet significatif sur les fonctions motrices, cependant elle révèle des fonctions cognitives affaiblies. Cet affaiblissement est plus marqué chez les femelles. **Scott et al. (2007)** montre dans une étude consacrée au nouveau né que l'exposition au toluène provoque des modifications de l'activité locomotrice différente selon l'âge du traitement et le sexe de l'animal.

**Shane et al. (2010)** travaillant sur des rats adolescents exposé au toluène, dressent le profil neurochimique au cours de cette phase. Les neurotransmetteurs étudiés sont les glutamates, le GABA dans le cortex CPFm et dans le striatum et l'hippocampe antérieur. Dans le CPFm le toluène réduit le glutamate et ne présente pas effet sur le GABA à 1 jour d'exposition ; après 7 jours d'exposition, le glutamate est le plus touché avec cependant une augmentation du GABA. Dans l'hippocampe, ni le GABA ni le glutamate n'ont été modifiés un jour après l'exposition, cependant, après 7 jours, les deux neurotransmetteurs sont augmentés. Dans le striatum il n'a été relevé aucune modification ni le 1<sup>er</sup> jour ni le 7<sup>ème</sup> jour. Concernant les récepteurs des neurotransmetteurs, il a été rapporté que le toluène inhibe l'excitabilité des récepteurs NMDA (**Cruz et al., 1998, 2000**) et les récepteurs acétylcholine nicotinique (**Bale et al., 2002**) améliorent les fonctions des récepteurs inhibiteurs tels que le GABAa ainsi que les récepteurs de la glycine (**Bale et al., 2005**). Pris ensemble, ces résultats montrent que le toluène est tantôt un inhibiteur pharmacologique et tantôt un stimulateur des neurotransmetteurs. Il a également été démontré (**Win-shwe et al., 2009b**) que le niveau de glutamate extra cellulaire augmente pendant la période d'apprentissage chez les souris témoins alors qu'il diminue chez les sujets traitées au toluène. De ceci, il ressort que

l'exposition au toluène provoque des modifications dans la neurochimie du cerveau et ces modifications peuvent se répercuter sur le système nerveux périphérique et sur les fonctions neuromotrices (**Goodwin et al. 1986**). Dans ce contexte, **Murata et al. (1991)** trouvent que l'exposition des rats à des solvants organiques provoque des changements significatifs dans les niveaux des catécholamines.

Dans une autre étude **Karin et al. (2004)**, a combiné, en même temps qu'une exposition prénatale au toluène, un stress chronique léger (CMS). Il a été trouvé chez les rats issus du traitement combiné, une amélioration des paramètres neuromoteurs. Enfin, **Pi-shih lo et al. (2009)** trouvent que le toluène provoque des altérations de l'activité locomotrice, la coordination motrice et l'apprentissage et attribuent ces troubles à la dopamine et aux récepteurs NMDA. Pour mettre en évidence son hypothèse, il a utilisé des antagonistes des récepteurs dopaminergiques D1SCH23390, un antagoniste des récepteurs D2 Raclopride et un antagoniste des récepteurs D3 Nafadotride, ainsi que la D-serine, un co-antagoniste de la glycine des récepteurs NMDA. Ces molécules ont été administrées avant l'exposition au toluène chez le rat. Le SCH23390, le Raclopride et le Nafadotride ont déprécié l'activité locomotrice et n'ont eu aucun effet sur les troubles neuromoteurs et cognitifs en réponse à l'effet du toluène. La D-serine réduit toutes les altérations comportementales signalées suite à l'exposition au toluène. De ceci il ressort que le blocage des récepteurs NMDA peut jouer un rôle crucial dans le rétablissement de l'hyperactivité locomotrice ainsi que les troubles moteurs et cognitifs, et il semble que la Dopamine peut être impliquée dans l'hyperactivité locomotrice (**Pastor et al., 2005 ; Leriche et al., 2003 ; Carter, 1994 ; Bale et al., 2007 ; Balster, 1998**).

Dans le test du plus maze test où nous avons essayé d'estimer le degré d'anxiété. Les rats, sexe confondu, ayant subis au préalable une exposition prénatale au toluène semblent vouloir explorer les endroits ouverts, un comportement contraire aux rongeurs qui ont une préférence innée pour les endroits clos. Les travaux de **SIDNEY M. et al (1998)** suggère que l'exposition prénatale au toluène peut inhiber certains aspects de la neurogenèse du cerveau antérieur. Ainsi durant la période d'expositions dans leur expérience correspondant au 6 au 19 jour de gestation tous les neurones à l'exception des

gyrus denté (corps godronné) de l'hippocampe sont conçus. Par conséquent, le développement de plusieurs populations de neurones du cerveau antérieur peut être affecté par l'exposition prénatale au toluène. Cela peut expliquer l'absence de méfiance innée des rats vis-à-vis du test de labyrinthe en croix surélevé dans nos travaux. Nos résultats ne consolident pas l'hypothèse selon laquelle « l'exposition antérieure subchronique au toluène conduit à des altérations persistantes dans la fonction cognitive, affective ou motrice ». Pareille conclusion a été avancée par **Beasley TE et al (2012)** pour leurs travaux sur l'exposition subaiguë au toluène, où aucun effet sur l'anxiété n'a été révélé au plus maze test. (**Tracey E. Beasley et al ., 2012**).

Dans nos résultats concernant les paramètres immunitaire, nous avons constaté que le toluène a provoqué chez la progéniture (parvenant à l'âge adulte de 70 jours) une immunosuppression généralisée illustrée principalement par une diminution du taux des globules blanc, des Immunoglobulines, des lymphocytes, des monocytes, des éosinophiles et des plaquettes chez les rats mâles adultes (70 jours)(tableau 29) et une diminution du taux des globules blanc, des lymphocytes, des monocytes chez les rattes femelles adultes (70 jours) (tableau 30). Par ailleurs, nous avons signalé une différence de la réactivité du système immunitaire à la dexaméthasone entre les femelles adultes (70 jours) (tableau 32) et les mâles (tableau 31).

Dans un autre contexte, **Sari et al. (2006)** signalent qu'une exposition au toluène peut agir sur l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien comme un facteur de stress qui aura comme conséquence une modification du système neuroendocrinien et immunitaire. **Farrar et al. (1986)** montrent que la sollicitation de l'axe HPA provoque la surproduction d'IL2 qui induit une prolifération lymphocytaire, la sécrétion accrue de corticostérone va provoquer l'inhibition des IL2 qui va aboutir à un affaiblissement des compétences immunitaires. Les différences de réactivité constatées chez les femelles adultes (70 jours) par rapport aux mâles adultes (70 jours) issus des mères traitées au toluène, pourraient nous amener à confirmer l'hypothèse de l'implication des stéroïdes neuroactifs évoqués dans la première partie de ce présent travail.

## 5. Conclusion

Dans notre étude, le stress prénatale a provoqué des altérations diverses chez la progéniture des rattees traitées au toluène ceci aussi bien sur le plan physique que neuromoteur. L'administration du toluène chez les femelles gestantes a provoqué une diminution du poids corporelle, un retard dans la durée d'ouverture des yeux et celle de la percée des incisives. Deux autres paramètres physiques ont subi aussi des modifications à savoir le sex ratio et la taille de la portée. Sur le plan neurobiologique on signale une altération du SNC des rattons suite à l'exposition au toluène des mères. Ceci a été confirmé par les batteries de test. Le toluène peut franchir la barrière hémato-céphalique en provoquant une diminution du poids du cerveau ainsi que atrophie de l'hippocampe et aussi la mort cellulaire « apoptose ». L'exposition au toluène provoque des modifications de l'activité locomotrice c'est-à-dire du profil neurochimique. C'est donc au niveau du neurotransmetteur : GABA et du Glutamate que se produisent ces changements cela dépend de la durée d'exposition. Le toluène inhibe la stimulation des récepteurs NMDA et aussi les récepteurs acétylcholinergiques ; alors qu'il stimule la fonction des récepteurs inhibiteurs comme le GABA<sub>A</sub> et les récepteurs de la glycine. L'exposition à des solvants organiques comme le toluène provoque un état de stress donc augmente le taux de catécholamines dans le sang, aussi sur le plan immunitaire. La stimulation de l'axe HHS provoque la sécrétion de l'IL2 suite à une prolifération lymphocytaire ; La corticostérone va donc inhiber la production d'IL2 et conduira à un déficit immunitaire. Le toluène altère l'activité locomotrice et la coordination motrice via les récepteurs NMDA ceci a été bien démontré on en recourant à l'utilisation des antagonistes avant exposition au toluène chez le rat.



## CONCLUSION GENERALE

Le stress une notion qui porte à confusion elle désigne le stressant d'une part et la réponse elle-même d'autre part, l'intérêt porté à l'étude du stress est énorme vu le mode de vie que nous subissons au quotidien depuis des générations. Les interventions de l'environnement sont marquantes et décisives pour la construction et le fonctionnement du cerveau. Chaque organisme gère l'information qu'il reçoit et les réponses qu'il y donne selon certaines modalités d'équilibre ou de déséquilibre, et l'action de l'environnement au cours du temps peut déplacer les normes homéostatiques et créer des états allostatiques, sources de désadaptations. Ces influences, d'autant plus délétères qu'elles sont précoces, fragilisent le système nerveux central et conduiraient à l'apparition de maladies. Des « périodes critiques » pourraient ainsi être identifiées pendant le développement, au cours desquelles le programme génétique de développement serait sensible à des influences régulatrices épigénétiques. C'est le cas de la période prénatale, sensible aux variations de l'environnement externe, maternel. Ainsi, l'exposition de la mère pendant sa grossesse à un environnement stressant perturbe le développement psychobiologique de l'enfant.

Chez l'animal, différents modèles expérimentaux ont confirmé qu'un stress de la mère au cours de la gestation a des conséquences délétères sur le devenir de la progéniture. Ce stress maternel provoque un stress prénatal et son cortège de dérèglements au niveau des systèmes neuro-endocriniens, notamment de l'axe corticotrope et des systèmes de neurotransmission, en particulier sérotoninergique. Les rythmes biologiques sont perturbés, comme en témoignent le retard du développement psychomoteur, l'altération des capacités cognitives et la vulnérabilité accrue à développer des maladies. Dans notre cas de figure le

stress au toluène chez les rattes gestants semble s'atténuer au cours de la gestation car elle joue un effet modérateur sur la nocivité et la neurotoxicité du toluène, causées probablement par la sécrétion de divers facteurs (hormones stéroïdes neurostéroïdes). Cette réparation a un coût sur le développement de la progéniture des rattes traitées au toluène ainsi des altérations divers ont été observées aussi bien sur le plan physique que neuromoteur tels qu'une diminution du poids corporelle, un retard dans la durée d'ouverture des yeux et celle de la percé des incisives. Ces perturbations ne semblent pas aussi importante à l'âge juvénile (P21 –P45) ni à l'âge adulte (P70) dans notre model animal de stress prénatal au toluène. Néanmoins une exploration complémentaire sur le volet endocrinien et cytologique ainsi qu'immunologique est nécessaire pour parvenir à une conclusion close sur l'effet déployé du toluène à long terme sur notre model animal ainsi établit. Notre travaille contribue à la chaine de maillon entamée par d'autre travaux dans ce sujet aussi délicat que passionnant dans la tentative de compréhension du mécanisme de sensibilisation de l'organisme au toluène.

## REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUE

**A.P.I., 1978.** Teratology study in rats Toluene. American Petroleum Institute. LBI Proj. N.20847. Final report.

**A.T.S.D.R., 1994.** Toxicological Profile for Toluene (Update). Agency for Toxic Substances Disease Registry U.S. Public Health Service, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta. GA.

**Albrechet-Souza L., Cristina de Carvalho M., Rodrigues Franci C., Brandão ML., 2007.** Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previouslytic-like effects of mizolam. *Hormones and Behavior*. 52(2):267-73

**Al-Khouri H., Greenstein B.D., 1985.** Progesterone receptors in rat brain and uterus: dependence on the hormonal milieu. *J. Endocrinol.*, 107(2):159-62.

**Anderson I., Lundavist G.R., Pedersen O.F., Vaeth M., Wyon D.P., 1983.** Human response to controlled levels of toluene exposure. *Arch. Toxicol.* 72(2) :119-123.

**Andrade S., Silveira S.L., Arbo B.D., Batista B.A., Gomez R., Barros H.M., Ribeiro M.F., 2010.** Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.*, 99(5):687-90.

**Andrew L.S., Snyder R., 1986.** Toxicity of solvents and vapors. *In Casarett L.J. et Doulljed Toxicol. The basic science of poisons.* 3<sup>rd</sup> ed. New York, MC Millon Publishing CO. Chapitre 20: p.641.

**Bale A.S., Jackson M.D., Krantz Q.T., Benignus V.A., Bushnell P.J., Shafer T.J., Boyes W.K., 2007.** Evaluating the NMDA-glutamate receptor as a site of action for toluene, *in vivo*. *Toxicol. Sci.* 98, 159–166.

**Bale A.S., Smothers C.T., Woodward J.J., 2002.** Inhibition of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by the abused solvent, toluene. *Br. J. Pharmacol.* 137: 375–383.

**Bale A.S., Tu Y., Carpenter-Hyland E.P., Chandler L.J., Woodward J.J., 2005.** Alterations in glutamatergic and gabaergic ion channel activity in hippocampal neurons following exposure to the abused inhalant toluene. *Neuroscience.* 130: 197–206.

- Balster R.L., 1998.** Neural basis of inhalant abuse. *Drug Alcohol Depend.* 51: 207–214.
- Barbazanges A., Vallée M., Mayo W., Day J., Simon H., Le Moal M., Maccari S., 1996.** Early and later adoptions have different long-term effects on male rat offspring. *J Neurosci.* 16(23):7783-90.
- Barrot M., Vallée M., Gingras MA., Le Moal M., Mayo W., Piazza PV., 1999.** The neurosteroid pregnenolone sulphate increases dopamine release and the dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci.* 11(10):3757-60.
- Baulieu E.E., 1991.** Neurosteroids: A new function in brain. *Biology of the Cell*, 71: 3-10.
- Baulieu E.E., 1999.** Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr. Suppl.*, 88(433): 78-80.
- Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M., 2001.** Neurosteroids: beginning of the story. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2001; 46:1-32. Review.
- Beckstead M.J., Weiner J.L., Eger 2nd E.I., Gong D.H., Mihic S.J., 2000.** Glycine and Gamma-aminobutyric acid (A) receptor function is enhanced by inhaled drugs of abuse. *Mol. Pharmacol.* 57, 1199–1205.
- Bernardi M., Vergoni A.V., Sandrini M., Tagliavini S., Bertolini A., 1989.** Influence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression. *Physiol. Behav.*, 45: 1067-1068.
- Bharathi K.N., Natesh T.S., Ashwitha Reddy A., 2012.** Prenatal exposure to anti tubercular drugs and postnatal effect on growth, development and cognitive ability in rats. *Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.* 37: 203–209.
- Boey K.W., Foo S.C., Jeyaratnam J., 1997.** Effects of occupational exposure to toluene: a neuropsychological study on workers in Singapore. *Ann. Acad. Med. Singapore.* 26: 84-87.
- Boissier. JR., and Simon. P. 1965.** Action de la caféine sur la motilité spontanée de la souris. *Arch. Intpharmacodyn.* 1965 ; 158: 212-221.
- Bowen S.E., Batis J.C., Mohammadia M.H., John H. Hannigan J.H., 2004.** Abuse pattern of gestational toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 27 : 105–116.

- Bowen S.E., Charlesworth J.D., Tokarz M.E., Wright M.J. Jr, Wiley J.L., 2007.** Decreased sensitivity in adolescent vs. adult rats to the locomotor activating effects of toluene. *Neurotoxicology and Teratology*. 29: 599–606.
- Bowen S.E., Batis J.C., Mohammadi M.H., Hannigan J.H., 2005.** Abuse pattern of gestational toluene exposure and early postnatal development in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 27 : 105 - 116 .
- Bowen S.E., Hannigan J.H., 2006.** Developmental Toxicity of Prenatal Exposure to Toluene. *The AAPS Journal*. 8 (2) Article 49 (<http://www.aapsj.org>).
- Bowen S.E., Hannigan J.H., Cooper P.B., 2009.** Abuse pattern of gestational toluene exposure alters behavior in rats in a “waiting-for-reward” task. *Neurotoxicology and Teratology*. 31: 89–97.
- Bowen S.E., Irtenkaufa S., Hannigan J.H., Stefanskia A.L., 2009.** Alterations in rat fetal morphology following abuse patterns of toluene exposure. *Reproductive Toxicology*. 27: 161–169.
- Briceño F., Arcaya J.L., Carrizo E., Rincón J., Mosquera J.,2010.** Forced Swimming Test Decreases Chemotactic Responsiveness and Expression of CD11a in Rat Monocytes. *Neuroimmunomodulation*, 17(6): 369-78.
- Brown T.J., MacLusky N.J., 1994.** Progesterone modulation of estrogen receptors in microdissected regions of the rat hypothalamus. *Mol. Cell. Neurosci.*, 5(3):283-90.
- Carisson A., 1982.** Exposure to toluene : uptake distribution and elimination in man. *Scand. J. Vort. Environ. Health*. 8(1) : 43-55.
- Carla Cannizzaroa., Fulvio Plesciaa., Maria Martireb., Mauro Gaglianoa., Gaspare Cannizzaroa., Giacoma Mantiaa., Emanuele Cannizzaroa., 2006.** Single, intense prenatal stress decreases emotionality and enhances learning performance in the adolescent rat offspring: Interaction with a brief, daily maternal separation *Behavioural Brain Research* .169 (1):128–136.
- Carter A.J., 1994.** Many agents that antagonize the NMDA receptor–channel complex in vivo also cause disturbances of motor coordination. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269: 573–580.
- Cavalleri A., Gobba F., Nicali E., 2000.** Dose-related color vision impairment in toluene-exposed workers. *Arch. Env. Health*. 55: 399-404.
- Chouaniere D., Wild P., Fontana J.M., Hery M., Fournier M., Baudin V., Subra I., Rousselle D., Toamain J.P., Saurin S., Ardiot M.R., 2002.** Neurobehavioral

disturbances arising from occupational toluene exposure. *Am. J. Ind. Med.* 41: 77–88.

**Clark A.S., Roy E.J., 1985.** Behavioral in sensitivity to progesterone during lactation in female rats. *Physiol. Behav.*, 34(5):677-82.

**Coe CL., Lubach GR., Karaszewski JW., Ershler WB., 1996.** Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys. *Brain Behav Immun.*10(3):221-34

**Colomina M.T., Sanchez D.J., Domingo J.L., 1999.** Exposure of pregnant mice to aluminum and restraint stress: effects on postnatal development and behavior of the offspring. *Psychobiology.* 27: 521–529.

**Concas A., Follesa P., Barbaccia M.L., Purdy R.H., Biggio G., 1999.** Physiological modulation of GABA receptor plasticity A by progesterone metabolites. *European Journal of Pharmacology*, 375: 225-235.

**Cruz S.L., Balster R.L., Woodward J.J., 2000.** Effects of volatile solvents on recombinant N-methyl-d-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br. J. Pharmacol.* 131: 1303–1308.

**Cruz S.L., Mirshahi T., Thomas B., Balster R.L., Woodward J.J., 1998.** Effects of the abused solvent toluene on recombinant N-methyl-d-aspartate and non-Nmethyl-d-aspartate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 286: 334–340.

**Dantzer R., Kelly K.W., 1989.** Stress et immunity : an integrated view of relationship between the brain and immune system. *Life Sci.* 44 : 1995-2008.

**Da-Silva V.A., Malheiros L.R., Bueno F.M.R., 1990.** Effects of toluene exposure during gestation on neurobehavioral development of rats and hamsters. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 23: 533±537.

**Da-Silva V.A., Malheiros L.R., Figueiredo L.F.H., Sa-Rego M.M., Paumgarten F.J.R., 1991.** Neurobehavioral development of rats exposed to toluene through maternal milk. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23: 533-537.

**De Bold J.F., Frye C.A., 1994.** Genomic and non-genomic actions of progesterone in the control of female hamster sexual behavior., *Horm. Behav.*, 28(4):445-53.

**De Nicola A.F., 1993.** Steroid Hormones and Neuronal Regeneration. *Advances in Neurology*, 59:199-206.

- Deleu D., Hanssens Y., 2000.** Cerebellar dysfunction in chronic toluene abuse: beneficial response to amantadine hydrochloride. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 38: 37–41.
- Denenberg, V. H. 1969.** Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann. NY Acad. Sci.* 159:852-859
- Désarnaud F., Do Thi A.N., Brown A.M., Lemke G., Suter U., Baulieu E.E., Schumacher M. 1998.** Progesterone stimulates the activity of the pro-moters of peripheral myelin protein-22 and P0 genes in Schwann cells. *J. Neurochem.*, 71(4):1765-8.
- Detke M.J., Rickels M., Lucki I., 1995.** Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol.*, 121: 66-72.
- Doerr H.K., Siegel H.I., Rosenblatt J.S., 1981.** Effects of progesterone withdrawal and estrogen on maternal behavior in nulliparous rats. *Behav. Neural Biol.*, 32(1):35-44.
- E.T.A.P., 2001.** Rapport d'étude. Ethologie Appliquée. Ingredia. No18/1100/ING 911.Toxicologie Comportementale.
- Echeverria .D., Fine.L., Langolf.G., Schork.T.,Sampaio,C.,1991.** Acute behavioural comparisons of toluene and ethanol in human subjects.*Br.j.ind.Med.*48,
- Eller N., Netterstrom B. , Laursen P., 1999.** Risk of chronic effects on the central nervous system at low toluene exposure. *Occup. Med.* 49(6): 389-395.
- Farrar W.L., Cleveland J.L., Beckner S.K., Bonvini E., Evans S.W., 1986.** Biochemical and molecular events associated with interleukin 2 regulation of lymphocyte proliferation. *Immunol. Rev.* 92: 49–65.
- Fernández-Guasti A., Picazo O., 1999.** Sexual differentiation modifies the allopregnanolone anxiolytic actions in rats. *Psychoneuroendocrinol.*, 24(3):251-67.
- FESTING, M.F.W., 1979** : Suitability of the rat for different investigations. In: *Inbred and genetically defined strains of laboratory animals, part I, mouse and rat Fed. Am. Soc. Exper. Biol.* 237-238.
- File. SE., Zangrossi. HJR., Sanders. FL. and Mabbutt PS. 1994.** Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl).* 113:543-546.

- Fink G., Summer B.W., McQueen J.K., Wilson H., Rosie R., 1998.** Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin Exp Pharmacol. Physiol.* 25(10):764-75.
- Fisher C.J., Slotoman G.L., Opal T., 1991.** IL-1 Receptor antagonist (IL-1RA) reduces mortality in patient with sepsis syndrome. The American college of physicians. San Francisco. California. U.S.A. 13-6-November.
- Fleming A.S., Luebke C., 1981.** Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol. Behav.*, 27: 863-870.
- Frih H., Ali Rachedi B., Djenidi R., Frih N., Tahraoui A., Bairi A., 2010.** Le Kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Can J Physiol Pharmacol.*, 88(7):733-44.
- Frih H., Latreche A., Ali Rachedi B., Djenidi R., Sahraoui L., Tahraoui A., 2012.** Evolution of Elevated Plus Maze Test (Anxiety) and Porsolt Swimming Test (Depression) parameters in Wistar female rats treated with low dose of Toluene from the 4th to 14th day of pregnancy: Implication of Progesterone to protect GABAergic route. *J. Depression & Anxiety.* 1(2):2-6.
- G. von Euler., S.-O. Ogren., S.C. Bondy., M. McKee., M. Warner., J.-A. Gustafsson., P. Eneroth., K. Fuxe., 1991.** Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. *Toxicology.* 67 : 333-349.
- Galea L.A.M., Ormerod B.K., Sampath S., Kostaras X., Wilkie D.M., 2000.** Phelps M.T. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. *Hormones Behav.*, 37: 86-95.
- Garcia-Segura L.M., Naftolin F., Hutchison J.B., Azcoitia I., Chowen J.A., 1999.** Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J. Neurobiol.*, 40(4): 574-84.
- Goodwin J.S., Atluru D., Sierakowski S., Lianos E.A., 1986.** Mechanism of action of glucocorticosteroids. Inhibition of T cell proliferation and interleukin 2 production by hydrocortisone is reversed by leukotriene B4. *J. Clin. Invest.* 77: 1244–1250.
- Gospe S.M., Saeed D.B., Zhou S.S., 1994.** The effects of high-dose toluene on embryonic development in rat. *Pediatr. Res.* 36(6): 811-815.



- Gospe S.M., Zhou S.S. , Saeed D.B., Zeman F.J., 1996.** Development of a rat model of toluene-abuse embryopathy. *Pediatr. Res.* 40(1): 82-87.
- Gospe S.M., Zhou S.S., 1998.** Toluene abuse embryopathy: Longitudinal neuro developmental effects of prenatal exposure to toluene in rats. *Reprod. Toxicol.* 12(2): 119-126.
- H.S.D.B., 1999.** Toluene. Hazardous Substances Data Bank. National Library of Medicine. <http://www.toxnet.nlm.nih.gov>.
- Handley, S.L. and Mithani, S., 1984.** Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 327 : 1-5.
- Hass U., Lund S.P., Hougaard K.S., Simonsen L., 1999.** Developmental neurotoxicity after toluene inhalation exposure in rats. *Neurotoxicol Teratol.* . 21(4):349-57.
- Hass U., Lund S.P., Simonsen L., A. Fries S., 1995,** Effects of Prenatal Exposure to Xylene on Postnatal Development and Behavior in Rats. *Neurotoxicol Teratol.* 17(3):341-9.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S., 1994 .** Prenatal stress increases the hypothalamicpituitary- adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol* . 6 : 341-5.
- Kishi, R., Harabuchi, I., Katakura, Y., Ikeda, T., Miyake, H., 1993.** Neurobehavioral effects of chronic occupational exposure to organic solvents among Japanese industrial painters. *Environ. Res.* 62, 303–313.)
- S Maccari., M Vallée., V Mayo., M Le Moal .,1997.** Stress prénatal au cours de la grossesse et conséquences métaboliques chez le rat adulte. *Archives de Pédiatrie* .4(2) :138–140).
- Hougaard K.S., Andersen M.B., Hansen M. , Hass U., Wergeb T., Lunda S.P., 2004.** Effects of prenatal exposure to chronic mild stress and toluene in rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 27: 153–167.
- Hougaard K.S., Hass U., Lund S.P., Simonsen L., 1998.** Effects of Prenatal Exposure to Toluene on Postnatal Development and Behavior in Rats. *Neurotoxicology and Teratology.* 21(3): 241–250.

**Hougaard K.S., Hass U., Lund S.P., Simonsen L., 1999.** Effects of prenatal exposure to toluene on postnatal development and behavior in rats. *Neurotoxicology and Teratology*. 21:241–50.

**Hwei-Hsien Chen., Chao-Ting Wei., Yi-Ruu Lin., Te-Hsiung Chien., Ming-Huan Chan., 2005.** Neonatal Toluene Exposure Alters Agonist and Antagonist Sensitivity and NR2B Subunit Expression of NMDA Receptors in Cultured Cerebellar Granule Neurons *TOXICOLOGICAL SCIENCES* 85: 666–674

**IUCLID., 1998.** Toluene. International Uniform Chemical Information Database, European Commission ISPRA. CD-ROM.

**japan society for occupational health,1994.** toluene *indMed* 36. 103-110

**Jarosz P.A., Fata E., Bowen S.E., Jen K.L.C., Coscina D.V., 2008.** Effects of abuse pattern of gestational toluene exposure on metabolism, feeding and body composition. *Physiology & Behavior*. 93: 984–993.

**Kamran S., Bakshi R., 1998.** MRI in chronic toluene abuse: low signal in the cerebral cortex on T2-weighted images. *Neuroradiology*. 40: 519–521.

**Kastrup Y., Hallbeck M., Amandusson A., Hirata S., Hermanson O., Blomqvist A., 1999.** Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.*, 275(2): 85-8.

**Kawaura K., Honda S., Soeda F., Shirasaki T., Takahama K. A., 2010.** Novel antidepressant-like action of drugs possessing GIRK channel blocking action in rats. *Yakugaku Zasshi*, 130(5): 699-705.

**Khisti R.T., Chopde C.T., 2000.** Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one in mice. *Brain Research.*, 865: 291-300.

**Kirby L.G., Lucki I., 1997.** Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, 282: 967-976.

**Kirk-Othmer, 1997.** Encyclopedia of chemical technology. New-York : John Wiley & sons. 24 : 350-389.

**Koehl M., Darnaudéry M., Dulluc J., Van Reeth O., Le Moal M., Maccari S., 1999 .** Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal

axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J Neurobiol.* 40(3):302-15.

**Landa A.I., Gargiulo A.J., Gargiulo M.M., Cabrera R.J., Bregonzio C., Lafuente Sánchez J.V., Gargiulo P.A., 2009.** Alpha and beta noradrenergic mediation of NMDA glutamatergic effects on lordosis behaviour and plasmatic LH concentrations in the primed female rat. *J. Neural. Transm.* 116(5): 551-7.

**Lee Y.L., Pai M.C., Chen J.H., Guo Y.L., 2003.** Central neurological abnormalities and multiple chemical sensitivity caused by chronic toluene exposure. *Occup. Med.* 53: 479–482.

**Leriche L., Schwartz J.C., Sokoloff P., 2003.** The dopamine D3 receptor mediates locomotor hyperactivity induced by NMDA receptor blockade. *Neuropharmacology.* 45, 174–181.

**Lesage, F Del-Favero, M Leonhardt, H Louvart<sup>1</sup>, S Maccari<sup>1</sup>, D Vieau and M Darnaudery.,2004.** Prenatal stress induces intrauterine growth restriction and programmes glucose intolerance and feeding behavior disturbances in the aged rat; *Journal of Endocrinology* .181 : 291–296.

**Lide D., 1998.** Handbook of chemistry and physics: Toluene. Boca Raton. CRC Press. 78th Ed.

**Lister R.G. 1987.** The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology.* 92: 180-185.

**Lo P.S, Wu C.Y., Suec H.Z., Chen H.H., 2009.** Acute neurobehavioral effects of toluene: Involvement of dopamine and NMDA receptors. *Toxicology.* 265: 34–40

**Lopez C., Lucki I., 2000.** Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacol.*, 22: 191-199.

**Lordi B., Patin V., Protais P., Mellier D., Caston J., 2000 .** Chronic stress in pregnant rats: effects on growth rate, anxiety and memory capabilities of the offspring. *Int J Psychophysiol.* 37(2):195-205.

**Majewska M.D., 1992.** Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.*, 38(4):379-95.

- Martinez L., Contreras C.M., Saavedra M., 1999.** Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Archives Medical Research*, 30: 286-289.
- Mc Ewen B.S., 1999.** Gonadal hormone regulation of synaptic plasticity in the brain: What is the mechanism? In *Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system*, E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher (Eds). Humana Press. Contemporary endocrinology, 233-254.
- Mellon S.H., 2007.** Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology and Therapeutics*, 116: 107-124.
- Miguel M.H., Patricia T.A.N., 2001.** Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinol.*, 26: 479-491.
- Molina M., Contreras M., Tellez-Alcántara P., 2000.** Antidepressant-like effects of pregnancy and progesterone in Wistar rats as measured in the differential reinforcement of the low-rate 72s task. *Psychopharmacol.*, 151: 306-311.
- Molina-Hernández M., Téllez-Alcántara N.P., Olivera-Lopez J.I., Jaramillo M.T., 2009.** Olanzapine plus 17-beta estradiol produce antidepressant-like actions in rats forced to swim. *Pharmacol Biochem Behav.*, 93(4):491-7.
- Montgomery KC. 1955.** The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol.* 48(4):254-60.
- Murata K., Araki, S., Yokoyama K., Maeda K., 1991.** Autonomic and peripheral nervous system dysfunction in workers exposed to mixed organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63, 335–340.
- N.I.O.S.H., 1994.** Pocket guide to chemical hazards. U.S. Department of Health and Human Services. DHHS (NIOSH) Publ. 94-116.
- Neubert D., Gericke C., Hanke B., 2001.** Multicenter field trial on possible health effects of toluene. II. Cross-sectional evaluation of acute low-level exposure. *Toxicology.* 168 : 139-183.
- Neumann I.D., Wigger A., Liebsch G., Holsboer F., Landgraf R., 1998.** Increased basal activity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 449-463.
- Neuroscience.* 104 : 1,71-9
- Numan M., 1978.** Progesterone inhibition of maternal behavior in the rat. *Horm. Behav.*, 11(2): 209-31.

- Numan M., Roach J.K., Del Cerro M.C.R., Guillamo'n A., Segovia S., Sheehan T.P., Numan. M.J., 1999.** Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Research.*, 830: 58-371.
- Ono A., Sekita K., Ogawa Y., 1995.** Reproductive and developmental toxicity studies of toluene: Teratogenicity study of inhalation exposure in pregnant rats. *J. Toxicol. Sci.* 20: 109–34.
- Pastor R., Miquel M., Aragon C.M., 2005.** Habituation to test procedure modulates the involvement of dopamine D2- but not D1-receptors in ethanol-induced locomotor stimulation in mice. *Psychopharmacology (Berl.)*. 182: 436–446.
- Paul S.M., Purdy R.H., 1992.** Neuroactive steroids. *Faseb. Journal*, 6: 2311-2322.
- Pellow. CP., File. SE. and Briley. M., 1985.** Validation of open : closed arm entries in Elevated plus maze as a measures of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods*. 14 :149.
- Perrine S.A., Shonagh K., O'Leary-Moore, Galloway M.P., Hannigan J.H., Bowen S.E., 2010.** Binge toluene exposure alters glutamate, glutamine and GABA in the adolescent rat brain as measured by proton magnetic resonance spectroscopy. *Drug and Alcohol Dependence*. 115: 101–106.
- Poltyrev T, Keshet GI, Kay G, Weinstock M., 1996 .** Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol.* 29(5):453-62.
- Porsolt R.D., LePichon M., Jalfre M. 1977.** Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*; 266, 730-732.
- Porsolt. RD., Anton. G., Blavet. N. and Jalfre. M. 1978.** Behavioral despair in rats . A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur.J. Pharmacol.* 47 : 379-391.
- Prut, L. and Belzung, C., 2003 .** The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3):3-33.

- Ramirez V.D., Zheng J., 1996.** Membrane sex-steroid receptors in the brain, *Front Neuroendocrinol.*, 17(4): 402-39. Review.
- Reddy D.S., Kaur G., Kulkarni S.K., 1998.** Sigma ( $\delta_1$ ) receptor mediated antidepressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *NeuroReport*, 9: 3069-3073.
- Robel P., Schumacher M. et Baulieu E.E., 1999.** Neurosteroids: From definition and biochemistry to physiopathologic function. In *Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system*, E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher (Eds). Humana Press. Contemporary endocrinology, 1-25.
- Roberts L.G., Nicolich M.J., Schreiner C.A., 2007.** Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat II. *Developmental Toxicity Reproductive Toxicology*. 23: 521–531.
- Rodgers. R.J. and Johnson NJ. 1995.** Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures, in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 297-303.
- Sari D.K., Kuwahara S., Tsukamoto Y., Hori H., Kunugita N., Arashidani K., Fujimaki H., Sasaki F., 2006.** Effects of subchronic exposure to low concentration of toluene on the hypothalamo-pituitary-adrenal gland axis of female mice. *J. Jpn. Soc. Atmos. Environ.* 41, 38–43.
- Savage J., Giarratano G., Bustamante-Forest R., Pollock C., Robichaux A., Pitre S., 2010.** Post-Katrina perinatal mood and the use of alternative therapies. *J. Holist. Nurs.*, 28(2):123-32.
- Schmidt P.J., Rubinow D.R., 1997.** Neuroregulatory role of gonadal steroids in humans. *Psychopharmacology Bulletin*, 33: 219-220.
- Scott E. Bowen., Jonathan D. Charlesworth. , Mary E. Tokarz.,M. Jerry Wright Jr., Jenny L. Wiley., 2007.** Decreased sensitivity in adolescent vs. adult rats to the locomotor activating effects of toluene, *Neurotoxicology and Teratology*. 29: 599–606.
- Scott E. Bowena ., Susan Irtenkaufa ., John H. Hannigana ., Adrienne L. Stefanskia., 2009.** Les modifications de la morphologie foetale rat suivantes caractéristiques de l'abus de l'exposition au toluène, *Reproductive Toxicology* 27 : 161-169.

**Seeman M.V., Lang M., 1990.** The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin*, 16: 185-194.

**Shi C.G., Wang L.M., Wu Y., Wang P., Gan Z.J., Lin K., Jiang L.X., Xu Z.Q., Fan M., 2010.** Intranasal Administration of Nerve Growth Factor Produces Antidepressant-Like Effects in Animals. *Neurochem Res.*, 35(9):1302-14.

**SIDNEY M. GOSPE, JR., SHAN SHAN ZHOU., 1998.** Toluene abuse embryopathy: Longitudinal neurodevelopmental effect of prenatal exposure to toluene in rats. *Reproductive Toxicology.* 12( 2) : 119-126.

**Smith S.S., Gong Q.H., Li X., Moran M.H., Bitran D., Frye C.A., Hsu F.C., 1998.** Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA-A-gated current and increases the GABA-A receptor alpha 4 subunit in association with increased anxiety. *J. Neuroscience.*, 18(14):5275-84.

**Sobrian SK1., Vaughn VT., Ashe WK., Markovic B., Djuric V., Jankovic BD., 1997.** Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ Res.* 73(1-2):227-41.

**Sylvia Kaiser Thorsten Nübold., Inga Rohlmann., Norbert Sachser., 2003.,** Pregnant female guinea pigs adapt easily to a new social environment irrespective of their rearing conditions. *Physiology & Behavior* 80(1) : 147–153.

**T'atrai E., Rodics K., Ungváry G., 1980.** Embryotoxic effects of simultaneously applied exposure to benzene and toluene. *Folia Morphologica.* 28 : 286–9.

**Takashima M., Katoh Y., Takeuchi Y., Takahashi K., 1991.** Effect of subchronic administration of methylcobalamin on the acetylcholine and choline content in the brain and locomotor activity in rats. *Jpn J Psychiatry Neurol.* 45(1):173-5.

**Tazumi T., Hori E., Uwano T., Umeno K., Tanebe K., Tabuchi E., Ono T, Nishijo H., 2005.** Effects of prenatal maternal stress by repeated cold environment on behavioral and emotional development in the rat offspring. *Behav Brain Res.* 162(1):153-60.

**Thiel R., Chahoud I., 1997.** Postnatal development and behavior of Wistar rats after

**Tin-Tin Win-Shwe ., Yasuhiro Yoshida ., Naoki Kunugita ., Shinji Tsukahara., Hidekazu Fujimaki., 2010.** Does early life toluene exposure alter the expression of NMDA receptor subunits and signal transduction pathway in infant mouse hippocampus?. *NeuroToxicology* 31: 647–653

**Tin-Tin Win-Shwe D. Mitsushima D., Nakajima S., Ahmed S., Yamamoto S., Tsukahara M., Kakeyama S., Goto H., Fujimaki H., 2007.** Toluene induces rapid and reversible rise of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice. *Toxicology Letters*. 168: 75–82.

**Tin-Tin Win-Shwe D., Fujimaki H., 2010.** Neurotoxicity of toluene. *Toxicology Letters* 198: 93–99.

**Toran-Allerand C.D., 1996.** Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 56: 169-78.

**Tracey E. Beasley Paul A. Evansky , Philip J. Bushnell., 2012.** Behavioral effects of sub-acute inhalation of toluene in adult rats. *Neurotoxicology and Teratology* 34 : 83–89.

**Tracey L Kurtzman., B.A., Kimberly N Otsuka., M.D., Richard A Wahl., M.D., 2001.** Inhalant abuse by adolescents *Journal of Adolescent Health*. 28(3) : 170–180.

**Ungvary G., 1984.** The possible contribution of industrial chemicals (organic solvents) to the incidence of congenital defects caused by teratogenic drugs and consumer goods. An experimental study. *Prevention of physical and mental congenital defects. Part A. The scope of the problem.* New York. A.R. Liss Inc.

**Valentine R., O'Neill A.J., Lee K.P., Kennedy G.L. JR., 1999.** Subchronic inhalation toxicity of dig lyme. *Food Chem. Toxicol.* 37 : 75-86.

**Van Den Hove D.L.A., Steinbusch H.W.M., Scheepens A., Van De Berg W.D.J., Kooiman L.A.M., Boosten B.J.G., Prickaerts J., Blanco C.E., 2006.** Prenatal stress and neonatal rat brain development. *Neuroscience*. 137, 145–155.

**Walsh. RN., and Cummins, R A. 1976.** The open-field test: A critical review. *Psychol.Bull.* 83:482-504.

**Wang, J.D., Chen, J.D., 1993.** Acute and chronic neurological symptoms among paint workers exposed to mixtures of organic solvents. *Environ. Res.*. 61 ;107–116



- Welberg LA., Seckl JR., Holmes MC., 2001.** Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour.
- Wieland S., Lucki I., 1990.** Antidepressant-like activity of 5HT-1A agonists measured with the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)*, 101(4): 497-504.
- Win-Shwe T.T., Hojo R., Mitsushima D., Nakajima D., Yamamoto S., Fujimaki H., 2009.** Establishment of a mouse model to assess brain neurotransmitter level and learning performance simultaneously following toxic chemical exposure: using in vivo microdialysis and schedule-controlled operant behavior. *J. U.O.E.H.* 31: 1–11
- Yamanouchi N., Okada S., Kodama K., Hirai S., Sekine H., Murakami A., Komatsu N., Sakamoto T., Sato T., 1995.** White matter changes caused by chronic solvent abuse. *Am. J. Neuroradiol.* 16, 1643–1649.
- Yu I.T., Lee N.L., Zhang X.H., Chen W.Q., Lam Y.T., Wong T.W., 2004.** Occupational exposure to mixtures of organic solvents increases the risk of neurological symptoms among printing workers in Hong Kong. *J. Occup. Environ. Med.* 46: 323–330.
- Zhvania M.G., Chilachava L.R., Japaridze N.J., Gelazonia L.K., Lordkipanidze T.G., 2011.** Immediate and persisting effect of toluene chronic exposure on hippocampal cell loss in adolescent and adult rats. *Brain Research Bulletin.* 87: 187–192.
- Zorilla E.P., Luborsky L., McKay J.R., 2001.** The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav. Immun.* 15:199-226.