



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE



UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE DOCTORAT 3^{EME} CYCLE

EN BIOLOGIE ANIMALE

Option : NEUROSCIENCE

Intitulé

***Etude du dysfonctionnement neurobiologique et physiologique
suite au stress de contention chez les rattes Wistar et leur
progéniture***

Présentée par : M^{elle} HALOUI Meriem

Devant le jury :

M BAIRI Abdelmadjid
M TAHRAOUI Abdelkrim
Mme AOUN Leila
Mme TADJINE Aïcha
M ACHOU Mohamed
M SOUIDI Maâmar

Professeur
Professeur
Professeur
Professeur
MCA
MCA

Président
Directeur
Examinatrice
Examinatrice
Examineur
Examineur

Université d'Annaba
Université d'Annaba
Université d'El Tarf
Université d'El Tarf
Université d'Annaba
IRSN-Fontenay-aux-Roses-
Paris-France

Année universitaire 2013 / 2014

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes remerciements et ma profonde gratitude avant tout à Dieu qui m'a donné la force, le courage et la volonté d'élaborer ce travail scientifique.

Je tiens à remercier messieurs les membres du jury pour leur collaboration durant l'examen de ce travail et leur participation à la soutenance.

J'adresse mes remerciements également à **Monsieur le Professeur Abdelkrim TAHRAOUI** pour son encadrement, sa grande disponibilité, ses encouragements et de m'avoir conseillé et fait partager ses connaissances. Qui m'a initié à la recherche et m'a inclus un savoir faire inestimable...Aussi pour la confiance qu'il m'a accordé tout au long de la thèse. Je tiens ici à vous exprimer toute ma gratitude et vous dire que j'ai beaucoup appris et j'ai pris confiance en moi à vos côtés, je vous dis merci d'avoir été si patient et compréhensif pendant la rédaction.

Je remercie **Monsieur le Professeur Abdelmadjid BAIRI** d'avoir accepté de juger ce travail et d'en présider le jury. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma grande reconnaissance pour sa disponibilité et sa grande sympathie, ces encouragements et son aide précieuse. Qu'il trouve ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Je remercie **Madame le Professeur Leila AOUN** d'avoir répondu favorablement et de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse. J'espère pouvoir montrer ici le signe de ma reconnaissance la plus sincère.

Je tiens aussi à remercier **Madame le Professeur Aïcha TADJINE** d'avoir bien voulu évaluer ce travail et de participer au jury de ma soutenance de thèse. Qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude et de l'estime que je lui porte.

Je remercie **Monsieur le Maître de conférences Maâmar SOUIDI** de m'avoir fait bénéficier, avec la plus extrême gentillesse. Qu'il me soit permis de lui témoigner ma respectueuse reconnaissance pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens à remercier vivement **Monsieur le Maître de conférences Mohamed ACHOU** d'avoir répondu favorablement pour juger et pour le grand honneur qu'il m'a fait d'assurer la charge de rapporteur de ce travail.

Un merci infini à tous mes collègues du laboratoire de Neuroendocrinologie appliquée.

J'adresse mes remerciements à ma famille et mes amis pour leur encouragement et leur soutien. Un grand merci à mes parents qui m'ont donné la possibilité de suivre de longues études. Un grand merci à maman qui a orchestré toutes mes tâches, elle m'a donné de l'énergie pour que mon cortisol soit bénéfique et empêche les effets délétères de la rédaction, je vous dis ici merci mon système limbique.

ABSTRACT

The stress is a very important current issues as well as at the man and the animal. Each individual, human and animal, is confronted in his everyday life to stressful situations. Several protocols of stress in rats have been developed to study the effects of gestational stress on the offspring development, in particular the physical and chemical stressors. But no study in rats has been made on the effects of psychological stress applied before gestation on the later development of the offspring.

We aim by this experiment to study the effects of the chronic exposure to restraint stress (before gestation) on the rat female and the neurobehavioral and physical development of their offspring.

The study was undertaken on the female Wistar rats, the latter have underwent a chronic restraint stress for (1hour /day, 4 days / week for 5 weeks). Behavioral sequences were recorded after stress and a retro-orbital sampling was realized in order to study the biochemical, hormonal, immunological parameters and form blood counts. The rats were decapitated for measuring of the relative weight of organes (the brain, adrenals glands, thymus, spleen, liver and thyroid). Concerning offspring, monitoring of physical and neuromotor development was performed before and post-weaning and behavioral tests during post weaning (adolescence) to assess neurodevelopmental behavior (locomotors activity and spatial memory).

Our results showed in stressed rats

Increased anxiety with the appearance of the depression evaluated in plus maze test, the open field test and the forced swimming test respectively.

Impairment of spatial memory.

Decreased organs weight (brain, spleen, thymus) and increased thyroid weight and the adrenals glands.

Disruption of the energetic metabolism (reduction of cholesterol, increase of glycemia and triglycerides).

Disruption of hematological parameters (parameters of ventilation) and the immune cells entering in cell and humoral response (white blood cells, monocytes, platelets, lymphocytes) respectively accompanied by an increase in the plasma concentration of immunoglobulin (IgG).

Disruption of the HPG axis revealed by the increase of the plasmatic progesterone.

Disruption of physical and behavioral offspring development observed before and after weaning (locomotors activity, spatial memory).

Key words: Pregestational Stress; Neurobehavioral and Physiological Disorders, Offspring Development; Behavioral Effects, Depression, Memory.

الإجهاد هو من أهم القضايا في الوقت الحالي سواء عند حيوان. معرض في حياته اليومية الإجهاد.

تم تطوير العديد من البروتوكولات الهادفة الإجهاد الكيميائي،

نهدف بهذه التجربة دراسة تأثير التعرض المزمن للإجهاد النفسي قبل الحمل عند الفئران ويستار و النمو العصبي السلوكي و الجسدي لأبنائهم.

أجريت هذه التجربة على فئران ويستار بعد تعرضهم الإجهاد النفسي المزمن لمدة ساعة في اليوم لمدة أربعة أيام في خمسة أسابيع يها الإجهاد وأخذت عينة دم جيب العين البيوكيميائية ، الهرمونية المناعية و شكل تعداد الدم .

مجموعة من الفئران تم ذبحها من أجل معرفة الوزن النسبي للأعضاء التالية (الدماغ، الغدة الكظرية، الغدة السعترية، الطحال، الكبد و الغدة الدرقية) فيما يخص الأولاد تم رصد نموهم حركي قبل الفطام و آخر الاختبارات السلوكية تم خلال فترة المراهقة لتقييم السلوك و النمو العصبي (النشاط الحركي و الذاكرة المكانية) و التجربة أظهرت النتائج التالية:

زيادة التوتر مع ظهور الاكتئاب المقيم في المتأهة في الذاكرة المكانية.

انخفاض وزن الأعضاء (الدماغ، الطحال ، الغدة السعترية) و زيادة وزن (الغدة الدرقية و الغدة الكظرية).

ب الطاقة الأيضية (انخفاض الكولسترول ، زيادة نسبة السكر في الدم و الدهون الثلاثية).

اضطراب في العناصر الدموية (عناصر التهنونة) و خلايا الجهاز المناعي التي تدخل في الاستجابة المناعية الخلطية (كريات دموية بيضاء وحيدات النواة، الصفائح الدموية و الخلايا اللمفاوية) المرفقة بزيادة في الغلوبولين المناعي (IgG).

HPG التي تم الكشف عنها بزيادة نسبة البروجستيرون في الدم.

(الذاكرة المكانية).

والنمو الفسيولوجي،

المفتاحية: الإجهاد

RESUME

Le stress est une problématique actuelle très importante aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Chaque individu, humain et animal, est confronté dans sa vie quotidienne à des situations stressantes. Plusieurs protocoles de stress chez le rat ont été développés pour étudier les effets du stress gestationnel sur le développement de la progéniture, notamment les stressseurs physiques et chimiques. Mais aucune étude chez le rat n'a été faite sur les effets du stress psychologique appliqué avant gestation sur le développement ultérieur de la progéniture.

Nous visons par cette expérimentation à étudier les effets de l'exposition chronique au stress de contention (avant gestation) sur les rattes wistar et sur le développement neurocomportemental et physique de leur progéniture.

L'étude a été menée sur des rattes wistar, ces dernières ont subi un stress chronique de contention (1h/jour/4jours/semaine pendant 5semaines). Des séquences comportementales ont été enregistrées après le stress et un prélèvement rétro-orbitaire a été réalisé en vue d'étudier les paramètres biochimiques, hormonaux, immunologiques et la formule de numération sanguine. Des rattes ont été décapitées pour la mesure du poids relatif des organes (Le cerveau, les surrénales, le thymus, la rate, le foie et la thyroïde). Concernant la progéniture, un suivi de développement physique et neuromoteur a été réalisé avant sevrage et des tests comportementaux après sevrage au cours de l'adolescence afin d'évaluer le comportement neurodéveloppemental (activité locomotrice et mémoire spatiale).

Nos résultats ont montré chez les rattes stressées une Augmentation de l'anxiété avec apparition de la dépression évaluée dans les tests du labyrinthe en croix surélevée, du champ ouvert et de la nage forcée respectivement.

Altération de la mémoire spatiale.

Diminution du poids des organes (cerveau, rate et thymus) et une augmentation du poids de la thyroïde et la glande surrénale.

Perturbation du métabolisme énergétique (diminution du cholestérol, augmentation de la glycémie et des triglycérides).

Perturbation des paramètres hématologiques (paramètres de ventilation) et les cellules du système immunitaire entrant dans la réponse cellulaire et humorale (globules blancs, monocytes, plaquettes, lymphocytes) respectivement accompagnée d'une augmentation de la concentration plasmatique des immunoglobulines (IgG).

Perturbation de l'axe HPG révélée par l'augmentation de la progestérone plasmatique.

Perturbation du développement de la progéniture sur le plan physique et comportemental observée avant et après sevrage (activité locomotrice, mémoire spatiale).

Mots clés : Stress Pregestationnel, Désordres Neurocomportementaux et Physiologiques, Développement de la Descendance, Effets Neurocomportementaux, Dépression, Mémoire.

LISTE DES FIGURES

N°	Figure	Page
01	Les trois structures de l'axe hypothalamo-hypophysio-corticosurrénalien.	2
02	Illustration du stress de contention chez le rat.	8
03	Test du champ ouvert (Open Field).	9
04	Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus-maze).	10
05	Test aquatique de Morris (Morris water maze).	11
06	Test de la nage forcée (Forced swimming test).	12
07	Protocole expérimental (1).	19
08	Protocole expérimental (2).	25
09	Changement pondéral chez les rattes témoins et stressées.	27
10	Variation du poids relatif des organes (g/100g Poids vif) des rattes témoins et stressées.	28
11	Variation des paramètres du champ ouvert chez les rattes témoins et stressées.	29
12	Variation des paramètres du labyrinthe en croix surélevée chez les rattes témoins et stressées.	31
13	Variation des paramètres du test aquatique de Morris chez les rattes témoins et stressées.	32
14	Variation des paramètres de la nage forcée chez les rattes témoins et stressées.	33
15	Variation du taux de glucose plasmatique (g/l).	34
16	Variation de la concentration plasmatique du cholestérol (g/l).	34
17	Variation du taux des triglycérides (g/l).	35
18	Variation de la concentration plasmatique en progestérone (ng/ml).	36
19	Variation de la concentration plasmatique en IgG (g/l).	37
20	Variation des cellules du système immunitaire inné et adaptative chez les rattes témoins et stressées.	38
21	Variation des paramètres de la ventilation pulmonaire chez les rattes témoins et stressées.	39
22	Variation des paramètres de la reproduction chez les rattes témoins et stressées.	40
23	Poids corporel des rattons femelles (A) et des rattons mâles (B) entre PND 2 et PND18.	42
24	Percée des incisives (A) et ouverture des yeux (B) des rattons mâles et femelles.	43

25	Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test de retournement (PND3).	44
26	Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test d'agrippement (PND4).	45
27	Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test de réaction antigravitaire (PND9).	46
28	Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test de suspension (PND12).	47
29	Effets du stress chronique de contention sur le comportement des rats évalué dans le test de l'Open field. (A,B) représentent respectivement la distance parcourue et le temps passé dans le centre du dispositif à l'âge de 45 jours.	48
30	Temps de latence de la plateforme submergée à travers toutes les épreuves en PND 50 dans le quadrant cible 3 chez les rattons mâles et femelles.	49
31	Temps de latence dans le quadrant cible 3 en PND 51 chez les rattons mâles et femelles (A). Temps passé dans le même quadrant chez les rattons mâles et femelles (B).	49
32	Trajet de la réponse au stress avec une légère modification.	52
33	Synthèse des hormones dérivant du cholestérol. P450c11 correspond à l'enzyme 11 β -hydroxylase. Le rat est dépourvu d'aldostérone synthase.	54
34	Rôle du stress dans le développement du syndrome métabolique.	56
35	Mécanisme d'activation du système immunitaire par un stress cognitif.	60
36	Collaboration entre les trois systèmes lors d'un stress émotionnel.	61
37	Effets de la programmation de l'axe HPA avant la grossesse.	63
38	Rôle du stress sur le développement placentaire du fœtus.	64

LISTE DES TABLEAUX

N°	Tableaux	Page
01	Différents tests appliqués avant et après sevrage chez les rattons mâles et femelles.	21

LISTE DES SYMBOLES

ACTH	: Adrénocorticotrophine hormone
ADN	: Acide désoxyribonucléique
B-HSD	: Enzyme 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
°C	: Degré Celsius
CRH	: Corticotrophin realizing factor
CRS	: Chronic restraint stress
dl	: Décilitre
EDTA	: Acide éthylène diamine tétra acétique
EPM	: Plus maze test
FST	: Forced swimming test
g	: Gramme
GABA	: Acide Gamma-Amino-Butyrique
GB	: Globule blanc
GCs	: Glucocorticoïdes
GR	: Globule rouge
GsR	: Récepteurs aux glucocorticoïdes
h	: Heure
HCT	: Hématocrite
HGB	: Hémoglobine
HHS	: Hypothalamo-hypophysio-surrénalien
HPG	: Hypothalamo-pituitaire-gonadique
HPA	: Hypothalamic–pituitary–adrenal axis
IgG	: Immunoglobuline G
J	: Jour
LYM	: Lymphocytes
MONO	: Monocytes
MsR	: Récepteurs aux Minéralcorticoïdes
MWM	: Morris water maze
NE	: Norépinéphrine (noradrénaline)
NO	: Monoxide d’azote
NK	: Natural killer

OF	: Open field test
PLQ	: Plaquettes
PND	: Postnatal day
ROS	: Reactive oxygen species
SNC	: Système nerveux central
TNF	: Facteur de nécrose tumoral
µL	: Microlitre

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	06
2. MATERIEL ET METHODES.....	07
2.1. Matériel biologique.....	07
2.1.1. Animaux d'élevage.....	07
2.1.2. Enceinte d'élevage	07
2.1.3. Suivi de la prise alimentaire et du poids corporel.....	07
2.2. Méthodes.....	07
2.2.1. Application du stress de contention.....	07
2.2.2. Mode de traitement.....	08
2.2.3. Etude comportementale.....	08
2.2.3.1. Test du champ ouvert (Open Field).....	08
2.2.3.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze).....	09
2.2.3.3. Test aquatique de Morris (Morris water maze).....	10
2.2.3.4. Test de la nage forcée (Forced swimming test).....	11
2.2.4. Prélèvements.....	12
2.2.4.1. Prélèvement sanguin.....	12
2.2.4.2. Prélèvement des organes.....	12
2.2.5. Etude des paramètres biochimiques.....	12
2.2.5.1. Détermination de la glycémie par la méthode du glucose oxydase.....	13
2.2.5.2. Détermination du cholestérol total par la méthode du cholestérol oxydase.....	13
2.2.5.3. Détermination des triglycérides par la méthode du glycérol phosphate.....	14
2.2.6. Etude des paramètres hormonaux.....	16
2.2.6.1. Etude de la progestérone.....	16
2.2.7. Etude des paramètres immunologiques.....	17

2.2.7.1. Etude de la concentration plasmatique en IgG.....	17
2.2.7.2. Etude des cellules du système immunitaire.....	18
2.2.8. Etude des paramètres de la ventilation pulmonaire	18
2.2.9. Accouplement.....	20
2.2.10. Etude de l'effet du stress sur les paramètres de la reproduction.....	20
2.2.10.1. Taux de fertilité.....	20
2.2.10.2. Taux de fécondité.....	20
2.2.10.3. Taux de productivité numérique.....	20
2.2.10.4. Taux de mortalité en croissance.....	20
2.2.10.5. Taux de mortinatalité.....	21
2.2.10.6. Sexe ratio (mâles par rapport aux femelles).....	21
2.2.11. Etude de l'effet du stress sur la descendance.....	21
2.2.11.1. Etude de l'effet du stress sur la descendance avant sevrage.....	22
2.2.11.1.1. Etude des paramètres de maturation physique des rattons.....	22
2.2.11.1.2. Etude des paramètres de maturation neuromotrice des rattons.....	22
2.2.11.2. Etude de l'effet du stress sur la descendance après sevrage.....	23
2.2.11.2.1. Etude des paramètres de maturation comportementale et cognitive des rattons.....	23
2.2.12. Etude statistique.....	26
3. RESULTATS.....	27
Etude maternelle.....	27
3.1. Variation des paramètres pondéraux des rattes.....	27
3.2. Variation du poids des organes.....	27
3.3. Variation du comportement.....	28
3.3.1. Test du champ ouvert (Open Field).....	29

3.3. 2. Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze).....	30
3.3.3. Test aquatique de Morris (Morris water maze).....	31
3.3.4. Test de la nage forcée (Forced swimming test)	32
3.4. Variation des paramètres biochimiques.....	33
3.5. Variation des paramètres hormonaux.....	35
3.5.1. Variation de la progestérone plasmatique.....	35
3.6. Variation des paramètres immunologiques.....	36
3.6.1. Variation de la concentration plasmatique en IgG.....	36
3.6.2. Variation des cellules du système immunitaire.....	37
3.7. Variation des paramètres de la ventilation pulmonaire.....	38
3.8. Variation des paramètres de la reproduction.....	39
Etude de la descendance.....	39
3.2.1. Effets du stress sur la descendance avant sevrage.....	41
3.2.1.1. Variation des paramètres de maturation physique des rattons.....	41
3.2.1.1.1. Poids corporel.....	41
3.2.1.1. 2. Eruption des incisives et ouverture des yeux.....	42
3.2.1. 2. Variation des paramètres de maturation neuromotrice des rattons.....	43
3.2.1. 2.1. Test de retournement (PND3).....	43
3.2.1. 2.2. Test d'agrippement (PND4).....	44
3.2.1. 2.3. Test de réaction antigravitaire (PND9).....	45
3.2.1. 2.4. Test de suspension (PND12).....	46
3.2.1.2. Effets du stress sur la descendance après sevrage.....	47
3.2.1.2.1. Variation des paramètres de maturation comportementale et cognitive des rattons.....	47
3.2.1.2.1.1. Test du champ ouvert (Open Field).....	47

3.2.1.2.1.2. Test aquatique de Morris (Morris water maze).....	48
4. DISCUSSION.....	50
Les mères.....	50
La descendance.....	62
5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	69
PUBLICATIONS	
COMMUNICATIONS	



1. INTRODUCTION

Chaque individu, humain et animal, est confronté dans sa vie quotidienne à des situations stressantes. Chez l'homme, le stress est omniprésent dans la vie personnelle et professionnelle. Le stress touche aussi le monde animal et représente un problème éthique et économique chez les animaux d'élevage. Une problématique importante en élevage est celle du bien-être animal. De nombreux concepts peuvent définir le bien-être, mais il se réfère principalement à l'état psychologique subjectif d'un animal en relation avec son environnement interne et externe (Rushen, 2003 ; Calvez, 2010 ; Yong *et al.* , 2012). De manière schématique, le bien-être animal peut se définir de trois façons différentes : l'absence de mortalité et de morbidité, l'absence de stress ou la possibilité d'exprimer les comportements naturels de l'espèce (Larrère, 2007). Le stress induit donc une diminution du bien-être. Ainsi, une mesure classique consiste à évaluer les marqueurs physiologiques de stress (Mormede *et al.* , 2007). Le maintien du bien-être animal est une obligation réglementaire permettant de respecter l'animal comme un être sensible mais est également d'une utilité économique car une baisse du bien-être engendre souvent une baisse de la productivité en élevage (Veissier *et al.* , 2007). La question du bien-être animal et de l'absence de stress dans les élevages est donc fondamentale aujourd'hui.

De nombreuses études ont été effectuées afin de cerner le rôle de divers facteurs contribuant dans le développement des désordres neuropsychiatriques tels que l'anxiété et la dépression (Vyas *et al.* , 2002 ; Yong *et al.* , 2012). Il a été rapporté que les stressseurs émotionnels et environnementaux influencent le fonctionnement du cerveau qui sont considérés comme des facteurs clés dans la genèse des désordres neuropsychiatriques (Seyle, 1936 ; Chrousos and Gold, 1992). Le stress de contention et d'immobilisation sont des stressseurs incluant une limitation du mouvement des animaux. Le stress de contention consiste à placer dans un tube en plastique, un grillage ou encore un cône en plastique souple ajusté à son corps (Buynitsky & Mostofsky, 2009) et le stress d'immobilisation consiste à attacher les pattes et le cou de l'animal par des sangles en métal (Ricart-Jane *et al.* , 2002). La composante physique de ces stressseurs n'est pas à l'origine du stress car elle ne constitue pas une menace réelle de l'homéostasie. Par contre, lors de l'exposition à ces stressseurs, le fait de ne pas pouvoir s'échapper est à l'origine d'un stress émotionnel pour l'animal (Dayas *et al.* , 2001 ; Calvez, 2010). Le stress de contention a été largement utilisé comme stress émotionnel (Seyle, 1936). Il a été démontré que l'exposition au stress chronique induit une diminution du poids corporel, une hypertrophie des surrénales et affecte aussi la plasticité neuronale



(Bhatnagar and Dallman, 1998 ; McEwen, 2005 ; Shuichi *et al.* , 2012). Plusieurs protocoles de stress ont été appliqués afin de cerner les mécanismes neuroendocrines impliqués dans l'évolution de l'anxiété et la dépression tant chez l'animal que chez l'humain. Le terme du stress est classiquement défini comme une réponse non spécifique à l'action des facteurs environnementaux sur le corps, et il est accompagné de divers changements physiologiques, émotionnels, comportementaux qui peuvent être liés à des adaptations de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) (Kulkarni and Juvekar, 2008 ; Ruder *et al.* , 2008 ; Fernandez *et al.* , 2010).

Les événements stressants activent l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) et augmentent la libération de l'hormone corticolibérine (CRH) du noyau para ventriculaire de l'hypothalamus, ce qui provoque la sécrétion de l'adrénocorticotrophine (ACTH) à partir de l'hypophyse antérieure. Cette dernière stimule la sécrétion de la corticostérone du cortex surrénalien à partir du cholestérol (Levine, 2005 ; Shuichi *et al.* , 2012).

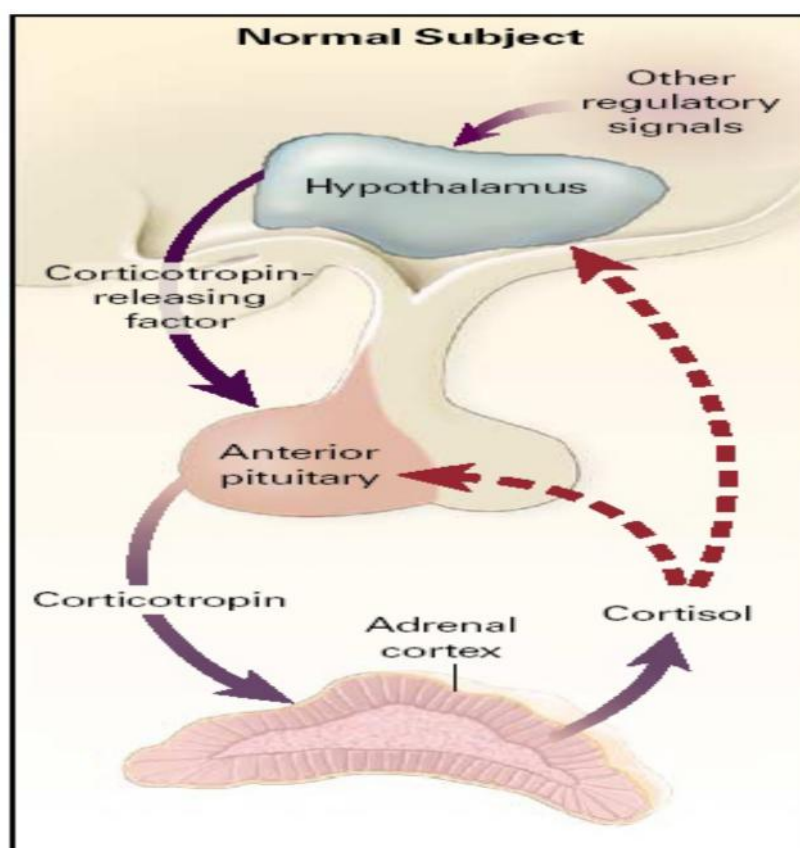


Figure 1. Les trois structures de l'axe hypothalamo-hypophysio-corticosurrénalien (Yehuda, 2002).

Les glucocorticoïdes sont capables de moduler de nombreux processus cellulaires tels que le métabolisme énergétique, le métabolisme des neurotransmetteurs (Datson *et al.* , 2008)



qui sont autant d'éléments intervenants dans la réponse au stress et dans le rétablissement de l'homéostasie. Le cholestérol est particulièrement abondant dans le système nerveux et est important dans de nombreux aspects de la structure et de la fonction cellulaire. Il assure la fluidité, la perméabilité des membranes cellulaires et les processus d'échange (Boston *et al.* , 1996 ; Heerklotz and Tsamaloukas, 2006). Un déséquilibre de la composition lipidique cérébrale semble impliqué dans l'apparition et le développement de certaines neuropathologies en particulier l'anxiété et la dépression (Perica and Delas, 2011 ; Ross, 2009 ; Freeman and Rapaport, 2011). Quelques auteurs présument que l'anxiété élevée est un facteur de risque de développement des autres désordres comportementaux (Carey and Damianopoulos, 2003).

Les fonctions reproductrices sont supprimées dans diverses conditions de stress comme le stress de contention, exercice laborieux, malnutrition, infection et trauma chirurgical (Keichrio and Hiroko, 2006). Un stress prolongé ou chronique cause l'anovulation ce qui en résulte l'infertilité due à la suppression des hormones gonadiques (Nakamura *et al.* , 2008).

Plusieurs études ont démontré que le stress émotionnel affecte le système immunitaire. La manière la plus commune pour identifier les possibles altérations au niveau du système immunitaire par un comptage complet des cellules contenues dans le sang, y compris les cellules du système hématopoïétique et le profil leucocytaire, et même les marqueurs biochimiques du stress (Nascimento *et al.* , 2004 ; Leandro *et al.* , 2006).

D'autres études démontrent que les facteurs environnementaux tels que le stress émotionnel (Dudley *et al.* , 2011 ; Yong *et al.* , 2012) auquel la mère est exposée tant chez l'homme que chez l'animal (Neigh *et al.* , 2013) peuvent influencer le comportement et le développement de la descendance (Mychasiuk *et al.* , 2011; Inhasz Kiss *et al.* , 2012). Ces changements pourraient être médiés par l'exposition intra-utérine aux glucocorticoïdes sécrétés pendant l'activation de l'axe HPA de la mère par le stress. Ceux-ci peuvent traverser la barrière placentaire en enrichissant ainsi le développement du cerveau fœtal (Charil *et al.* , 2010).

Le stress prénatal constituerait un facteur de risque d'accouchement prématuré par un mécanisme d'induction d'une décharge d'ocytocine (Lang *et al.* , 1983 ; Graignic-Philippe *et al.* , 2005). La prématurité fait partie des causes principales de mortalité périnatale et est associée à des troubles neuro-développementaux plus fréquents (Creasy, 1994 ; Graignic Philippe *et al.* , 2005). Les facteurs socio-psychologiques pendant la grossesse influenceraient le déroulement de celle-ci et expliqueraient, en partie, les complications observées. Le stress



dans le travail, que l'on peut aussi rapprocher des événements survenant régulièrement voire quotidiennement, semble aussi être un facteur important quant aux risques de prématurité, ou de complications périnatales qu'il ne faut pas négliger (Homer *et al.*., 1990 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005). Des études récentes ont été réalisées chez la femme enceinte. Elles mettent en évidence, de façon plus consistante, que les facteurs psychosociaux (comme le stress ou le soutien social) sont significativement corrélés avec l'incidence de devenir pathologiques à la naissance (prématurité) (Barbosa *et al.*., 2000 ; Da Costa *et al.*., 2000 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005). Des niveaux élevés d'anxiété maternelle prénatale ont été aussi retrouvés associés à la durée du travail (Pagel *et al.*., 1990 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005).

La majorité des études se sont plus particulièrement attachées à rechercher les effets du stress prénatal sur le faible poids de naissance du bébé, la prématurité ou bien encore les complications obstétricales. Plus récemment, les recherches se sont attachées à étudier les liens pouvant exister entre le stress prénatal et la survenue de malformations du fœtus ou d'avortements spontanés. Certaines recherches ont démontré que le stress semble avoir un effet direct sur la croissance cérébrale et il apparaît que le stress retentit sur la croissance cérébrale, et ce, indépendamment d'un effet sur le poids de naissance (Lou *et al.*., 1994 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005). En suggérant que le stress psychosocial augmenterait la prévalence des malformations, notamment au niveau de la crête neurale et jouerait un rôle essentiel durant l'organogenèse (Hansen *et al.*., 2000 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005). D'autres recherches ont été destinées pour étudier l'impact des événements de vie stressants sur les avortements spontanés, non liés à une anomalie chromosomique. Ils ont constaté que des événements négatifs récents (chômage, détérioration des relations avec son partenaire, décès, maladies graves dans l'entourage) étaient associés à des avortements spontanés, sans qu'aucune anomalie chromosomique ne soit responsable de la fausse couche (Neugebauer *et al.*., 1996 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005). Des études récentes se sont également intéressées aux relations pouvant exister entre d'une part le stress et l'anxiété prénatales, et d'autre part le développement psychomoteur et émotionnel des enfants. D'autres études ont mis en évidence une relation entre l'anxiété maternelle en fin de grossesse et les difficultés émotionnelles et comportementales, persistant après six ans, et qui sont observées aussi bien chez des garçons et des filles de quatre ans, même si les difficultés semblent plus importantes chez les garçons (O'Connor *et al.*., 2003 ; Graignic-Philippe *et al.*., 2005).



Chez l'homme, les facteurs génétiques et environnementaux influent sur la susceptibilité à de nombreuses maladies. En particulier, la qualité des relations entre un enfant-mère joue un rôle important pour le développement harmonieux et l'équilibre ultérieur de cet individu. Des perturbations de ces relations peuvent conduire notamment à des désordres émotionnels graves.

Pour évaluer la notion du stress, il faudrait aller voir les événements de vie qui ont longtemps occupé une place centrale et qui seraient susceptibles d'être source du stress. Ceux-ci correspondent à des événements importants qui se produisent dans la vie des sujets soulignant l'hypothèse étant que le stress résulterait de l'accumulation de changements qui imposent une adaptation (Graignic-Philippe *et al.*., 2005).

De plus en plus, des modèles expérimentaux animaux se développent afin de connaître les perturbations neurobiologiques qui sous-tendent une vulnérabilité à ces troubles. La modélisation chez l'animal reste cependant relative. Nous n'avons pas la prétention de reproduire la maladie humaine ; nous avons simplement accès à certains symptômes. La mise en place de modèles animaux de troubles comportementaux liés à ce genre de stress (Plus maze test, Open field test,..) pourrait contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques liés à la gestation et améliorer les stratégies thérapeutiques (Weiss *et al.*., 1998).

Dans le but de clarifier les effets du stress chronique de contention chez les rattes appliqué avant accouplement, nous avons procédé d'une part à étudier les paramètres du système immunitaire, endocrinien et nerveux et d'autre part l'évaluation des paramètres biochimiques. Après la mise-bas nous avons étudié les effets du stress chronique de contention sur le neurodéveloppement de la progéniture.

La première partie consiste à évaluer l'effet du stress chronique de contention chez les rattes wistar sur plusieurs paramètres maternels, à savoir le profil hématologique, immunologique (cellules du système immunitaire, IgG) et l'étude comportementale. Cette dernière a été réalisée à travers une batterie de tests largement répandus (l'Elevated Plus Maze, l'Open Field, Morris Water Maze, le Forced Swimming Test) et leur relation avec la réponse du système nerveux, immunitaire et endocrinien.



La deuxième partie a été effectuée chez la progéniture issue des mères stressées avant gestation. Nous avons procédé d'une part au suivi de l'évolution des paramètres physiques et neuromoteurs des rattons mâles et femelles issues des mères témoins et stressées à travers une batterie de tests (test de retournement, test d'agrippement, test de réaction antigravitaire, test de suspension) et d'autre part au suivi du développement comportemental et cognitif des jeunes par deux test (test de champs ouvert, test de labyrinthe aquatique de Morris).



2.1.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Animaux d'élevage

Le matériel biologique de base que nous avons choisi est le rat femelle de la souche wistar provenant de l'institut pasteur d'Alger. Les rattes sont des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs. La puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes. Une ratte en santé peut vivre entre 02 ans et demi à 03 ans dépendants de la souche, des conditions environnementales et autres variables (Baker *et al.*, 1980). A leur arrivée, ces rattes pesaient en moyenne 130 grammes, et au moment de l'expérimentation, elles pesaient en moyenne 160 ± 20 grammes. Ces rattes ont été couplées et leurs progénitures ont été utilisées pour l'évaluation neurodéveloppementale.

2.1.2. Enceinte d'élevage

Les animaux sont élevés dans des cages translucides en polyéthylène. Celles-ci sont tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Les cages ont été nettoyées et la litière changée une fois tous les deux jours. Les 34 rattes sont acclimatées deux mois aux conditions de l'animalerie, à une température moyenne de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, une hygrométrie de 50%. La nourriture apportée aux animaux est confectionnée sous forme de bâtonnets constitués de maïs, son, remoulage, soja, CMV (Sarl la production locale aliment souris et rats Bouzaréah-Alger). Quant à l'eau de boisson, elle est présentée dans des biberons *ad libitum*.

2.1.3. Suivi de la prise alimentaire et du poids corporel

A partir du premier jour les rattes ont été pesées quotidiennement et la quantité de la nourriture est mesurée à l'aide d'une balance GIBERTINI EU-C 1200.

2.2. Méthodes

2.2.1. Application du stress de contention (Bardin *et al.*, 2009)

Le modèle du stress de contention que nous utilisons dans notre laboratoire est celui de Bardin *et al.* en (2009). Il consiste à placer les rattes dans une bouteille cylindrique en plastique perforée 1 heure le matin à la même heure durant 4 jours par semaine pendant 5 semaines dans la même pièce d'hébergement. Après l'application du stress de contention,



toutes les rattes ont été ramenées dans leurs cages d'élevage. A la fin du protocole du stress les rattes des deux lots ont été mises en accouplement afin d'étudier les effets de ce type de stress sur les paramètres de reproduction (**Figure 2**).



Figure 2. Illustration du stress de contention chez le rat (Calvez, 2010).

2.2.2. Mode de traitement

Les 34 rattes ont été réparties en deux lots. Le premier lot comprend 17 rattes qui vont subir respectivement un stress de contention et le deuxième lot de 17 rattes constitue le témoin (lot basal).

2.2.3. Etude comportementale

Le comportement anxieux inné est une composante fondamentale du comportement général des rongeurs. Il se manifeste par l'attitude de l'animal à avoir peur lorsqu'il est mis, sans expérience préalable, dans un environnement non protégé. Ce comportement peut être évalué à l'aide de dispositifs expérimentaux validés dont les plus utilisés dans notre travail sont le labyrinthe en croix surélevée (*EPM, Elevated Plus Maze*), le champ ouvert (*OF, Open Field*), la nage forcée (*FST, Forced swimming test*) et le dispositif aquatique de Morris (*MWM, Morris water maze*). La série des tests comportementaux a été réalisée après à la fin du protocole du stress de contention (avant accouplement).

2.2.3.1. Test du champ ouvert (Open Field) (Hall, 1934)

Le test de l'Open Field, initialement décrit par Hall en (1934), a été développé dans le but de mesurer les différences de réactivité émotionnelle chez le rat.



Le dispositif se compose d'une base entourée par des parapets en plexiglas dont les mesures sont respectivement de 70cm×70cm×40cm. Le plancher est sous forme de carrés de 10cm×10cm de diamètre, il a été divisé en deux zones : zone centrale et zone périphérique dont chacune est de 35cm.

Le test de champ ouvert est réalisé pendant 5mn et l'animal est placé au centre du dispositif. Son déplacement permet de mesurer le nombre de carrés traversés ainsi que le temps passé dans chaque zone. De ce fait, ce test indique l'activité locomotrice et le comportement anxieux respectivement. Ce dernier est d'autant plus prononcé quand le rat passe plus de temps dans la zone périphérique. Quant à la zone centrale, son exploration représente un signe de moindre anxiété.

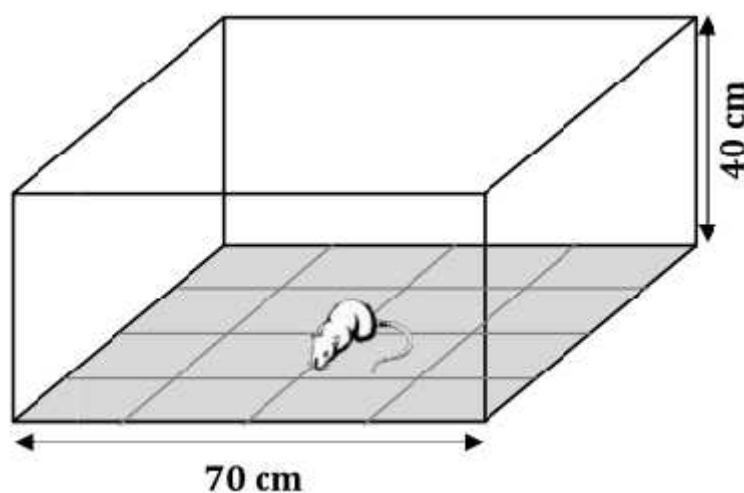


Figure 3. Test du champ ouvert (Open Field) (Hall, 1934).

2.2.3.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze) (Montgomery, 1955)

Le labyrinthe en croix surélevée est utilisé pour mesurer le degré d'anxiété chez les rongeurs (Handley and Mithami, 1984).

Le labyrinthe surélevée de 50cm du sol est composé de quatre bras en bois, deux bras ouverts (50×10cm) s'opposant perpendiculairement à deux bras fermés (50×10cm) avec 40cm de plexiglas haut bord. L'intersection des quatre bras (plate-forme centrale) mesurait 10cm (Montgomery, 1955 ; Roy, 2002).

Le test du labyrinthe en croix surélevée est réalisé pendant 5 min en plaçant l'animal dans l'aire centrale face à un bras ouvert. Etant donné que le rat craint les espaces vides et



hauts, son exploration dans les bras ouverts témoigne d'un comportement moins anxieux. A l'encontre, plus l'animal est localisé dans les bras fermés plus son comportement est désigné comme anxieux (Pellow *et al.* , 1985).

A l'issue de ce test, les paramètres suivants sont mesurés : le temps passé dans les bras ouverts, le temps passé dans les bras fermés, le nombre d'entrée dans les bras ouverts et le nombre d'entrée dans les bras fermés.

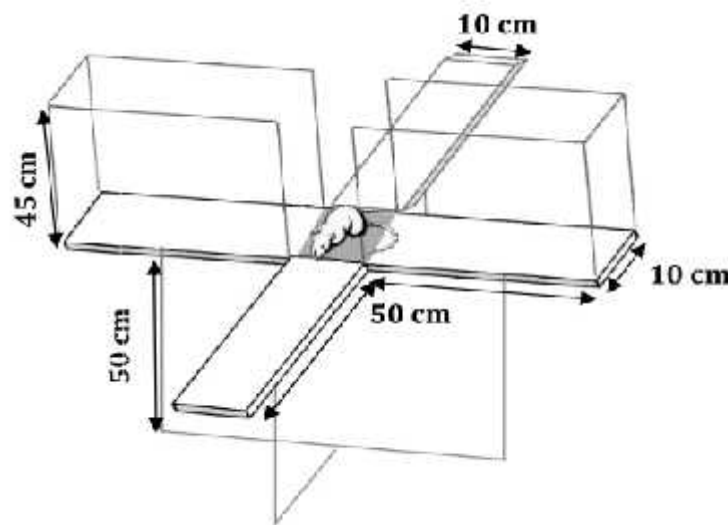


Figure 4. Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus-maze) (Handley and Mithami, 1984).

2.2.3.3. Test aquatique de Morris (Morris water maze) (Morris, 1981)

Le Morris Water Maze est utilisé pour identifier et évaluer l'apprentissage spatial et la mémoire des rongeurs (Morris, 1981).

Le bassin de Morris est une piscine circulaire de 120 cm de diamètre et 60 cm de profondeur, fabriqué en polypropylène et installé sur un support. Celui-ci est divisé en quatre quadrants ; l'un de ces derniers comporte une plate-forme légèrement immergée ; 1 cm au-dessous de la surface de l'eau (le quadrant cible 3). Il est rempli d'eau à 30 centimètres de profondeur. La température de l'eau est maintenue entre 22 et 32°C.

Le test de Morris comporte 4 jours d'essai avec 5 passages par jour (3 jours avec plateforme (apprentissage) et dans le 4ème jour 2 passages avec plateforme et 3 sans plateforme (mémorisation). La ratte est déposée dans l'eau en périphérie à des endroits



différents, elle nage jusqu'à trouver la plate-forme puis elle est retirée de l'eau. Le test est refait avec seulement un passage de 60 secondes. Si la ratte ne trouve pas la plate-forme au bout de 60 secondes, le passage est terminé et l'expérimentateur place l'animal sur la plate-forme pour dix secondes. La plate-forme est retirée au 4^{ème} jour du test et l'essai dure 60 secondes. Tous les essais sont filmés et les trois paramètres à enregistrer sont : le temps passé dans le quadrant cible, le nombre d'entrée dans le quadrant cible.

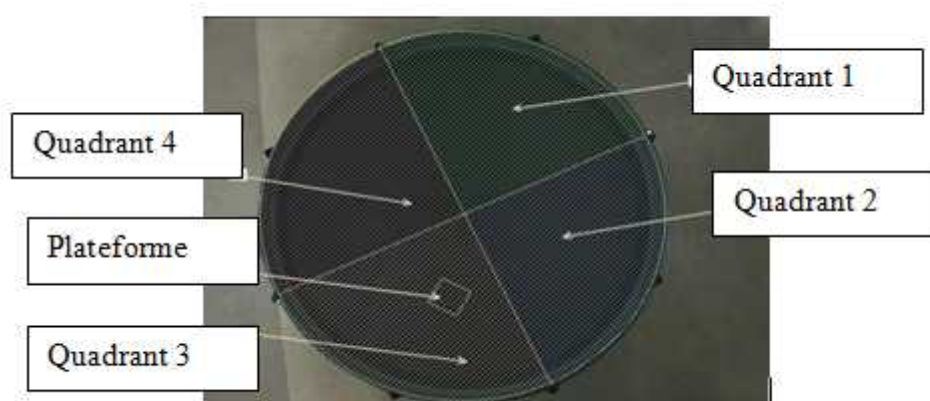


Figure 5. Test aquatique de Morris (Morris water maze) (Morris, 1981).

2.2.3.4. Test de la nage forcée (Forced swimming test) (Porsolt *et al.* , 1977)

Le test de la nage forcée ou test de Porsolt, est fréquemment utilisé pour examiner le comportement dépressif (Porsolt *et al.* , 1977).

Le dispositif de ce test est un aquarium 54cm×30cm×36cm de diamètre rempli d'eau à 40cm d'hauteur dont le rat ne se sert pas de ses membres inférieurs pour se tenir à la surface ni s'échapper ce qui le soumet à une nage forcée. L'eau a été régulièrement maintenue à (26°C). Ce test est composé de deux sessions espacées de 24 heures. Au cours de la première session les rattes ont été placées individuellement dans l'aquarium pendant 15 minutes, cette phase sert à provoquer une dépression mentale (session dépressinogène). La deuxième session dure 5mn au cours de laquelle, le temps d'immobilité, de nage et d'escalade sont mesurés.

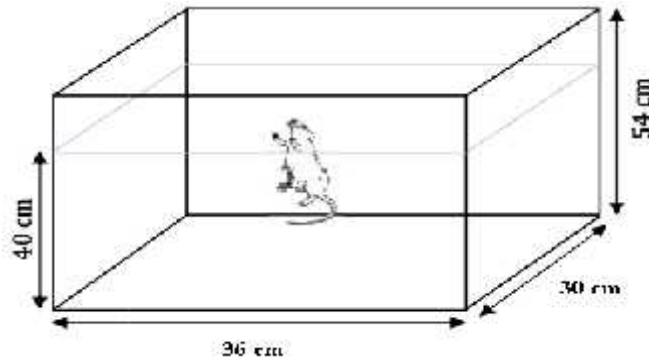


Figure 6. Test de la nage forcée (Forced swimming test) (Porsolt *et al.* , 1977).

2.2.4. Prélèvements

2.2.4.1. Prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins se font par ponction rétro orbitaire après le stress de contention pour les deux lots. Les échantillons sanguins sont recueillis dans des tubes héparinés pour l'étude hormonale (progestérone), tubes secs pour les paramètres biochimiques (Triglycérides, Cholestérol, Glycémie). Les autres prélèvements recueillis dans des tubes EDTA sont utilisés pour la mesure de la formule de numération sanguine et les paramètres immunologiques.

2.2.4.2. Prélèvement des organes

A l'issue de la période expérimentale, les animaux sont sacrifiés et les organes suivants ont été prélevés puis pesés à l'aide d'une balance de précision (SCALTEC SBC 51) : les organes de l'axe du stress (cerveau, surrénales), les organes de l'axe gonadotrope (les ovaires) et les organes du système immunitaire (thymus, la rate) et de l'axe thyroïdienne (thyroïdes) plus le foie pour le métabolisme énergétique (paramètres biochimiques). Le poids relatif des organes est calculé selon la formule :

$$\text{Poids relatif (g /100gPV)} = (\text{Poids de l'organe/Poids corporel individuel}) \times 100$$

2.2.5. Etude des paramètres biochimiques

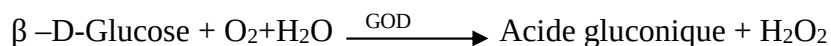
Le sang recueilli est centrifugé à 5000 tours par minute pendant 15 minutes.

Nous avons utilisé des coffrets Spinreact pour réaliser ce dosage (en suivant la fiche technique).



2.2.5.1. Détermination de la glycémie par la méthode du glucose oxydase (Trinder, 1969)

Le dosage s'effectue sur le plasma par la méthode enzymatique au glucose oxydase. Le glucose oxydase catalyse l'oxydation du glucose en acide gluconique.



L'hydrogène peroxydase ainsi formé en H_2O_2 est détecté par le phénol et 4-aminophenazone (4-AP) à la présence de la peroxydase pour donner enfin un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.



L'intensité de cette coloration est proportionnelle à la quantité du glucose présente dans l'échantillon.

Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Tris pH 7.4	92 mmol/L
	Phénol	0.3 mmol/L
Réactif 2 : Enzymes	Glucoseoxydase (GOD)	15000 U/L
	Peroxydase (POD)	1000 U/L
	4-Aminophenazone (4-AP)	2.6 mmol/L
Glucose calibrant	Glucose aqueux (standard) 100 mg/dL	

Procédure (voir tableau procédure triglycérides p16)

Dissoudre le contenu du réactif 2 dans le flacon du réactif 1 et mélanger légèrement. Mélanger, incubé pendant 10 min à 37°C, ou 15 à 20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 505 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

Calcul

Abs. = Absorbance

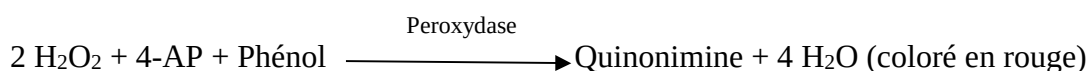
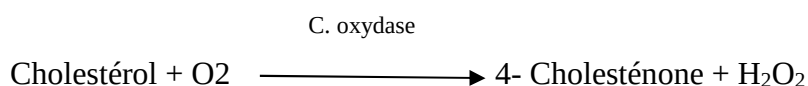
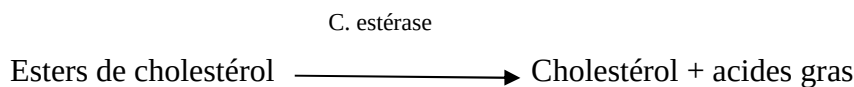
$\text{Abs. (Patient)} / \text{Abs. (étalon)} \times \text{Concentration étalon (100mg/dl)} = \text{glucose (mg/dl)}$

2.2.5.2. Détermination du cholestérol total par la méthode du cholestérol oxydase (Trinder, 1969)

La méthode de coloration de Trinder composé de peroxydase/phénol/4-aminoantipyrine, Il a été démontré que cette méthode, à l'aide d'étalons appropriés, produit



des résultats d'une excellente précision.

Principe

L'intensité de la couleur rouge produite, mesurée à 505 nm, est directement proportionnelle au cholestérol total présent dans l'échantillon.

Réactifs

Réactif R1 : Tampon	PIPES pH 6.9	90mmol/L
	Phénol	26mmol/L
Réactif R2 : Enzymes	Cholestérol estérase (CHE)	300 U/L
	Cholestérol oxydase (CHOD)	300 U/L
	Peroxydase (POD)	1250 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.4 mmol/L
Cholestérol calibrant	Cholestérol aqueux (standard) 200 mg/dL	

Procédure (voir tableau procédure triglycérides p16)

Dissoudre le contenu de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon).

Mélanger et incuber pendant 10 min à la température ambiante.

Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.

Calcul

$\text{Abs. (Patient)} / \text{Abs. (étalon)} \times \text{Concentration étalon (200mg/dl)} = \text{Cholestérol (mg/dl)}$

2.2.5.3. Détermination des triglycérides par la méthode du glycérol phosphate (Trinder, 1969)

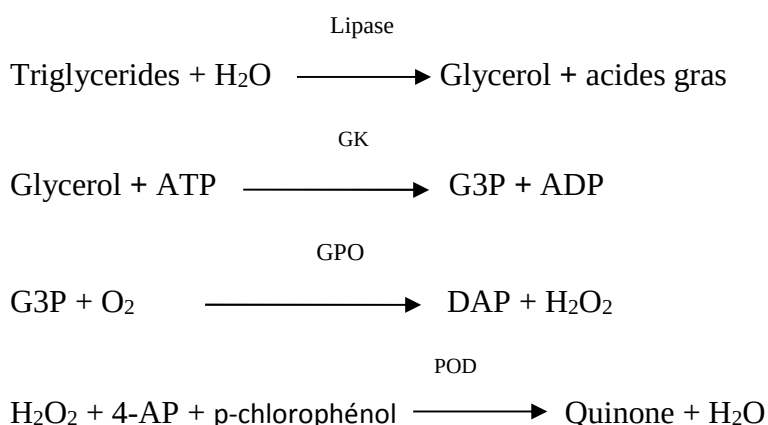
L'incubation des triglycérides de l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et des acides gras. Le glycérol est converti en glycérol-3-phosphate (G3P)



et adénosine diphosphate (ADP) par le glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (G3P) est ensuite converti par le glycérol phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminophénazone (4-AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner de la quinone complexe coloré en rouge.

Principe



L'intensité de la couleur rouge produite, est directement proportionnelle aux triglycérides totaux présents dans l'échantillon.

Réactifs

Réactif R1 : Tampon	GOOD pH 7.5	50mmol/L
	p-Chlorophénol	2mmol/L
Réactif R2 : Enzymes	Lipoprotéine lipase (LPL)	150000 U/L
	Glycérol kinase (GK)	500 U/L
	Glycérol-3-oxydase (GPO)	2500 U/L
	Peroxydase (POD)	440 U/L
	4-Aminophénazone (4-AP)	0.1 mmol/L
	ATP	0.1 mmol/L
Triglycérides calibrant	Triglycérides aqueux (standard) 200 mg/dL	

Procédure

Dissoudre le contenu du réactif 2 dans le flacon du réactif 1 et mélanger légèrement.



	Blanc	Tampon	Echantillon
Réactif du travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Tampon (µl)	--	10	--
Echantillon (µl)	--	--	10

Mélanger et laisser incuber dans la température ambiante pendant 10 min, puis lire l'absorbance de l'échantillon à 505nm et de l'étalon contre le blanc. La coloration est stable pendant 30 minutes.

Calcul

Abs. = Absorbance

Abs. (Patient)/ Abs. (étalon) x Concentration étalon (200mg/dl) = Cholestérol (mg/dl)

2.2.6. Etude des paramètres hormonaux**2.2.6.1. Etude de la progestérone (Engvall and Perlman, 1971)**

Les prélèvements de sang ont été centrifugés à 1500 tours/minute pendant 10 minutes.

Principe

La méthode est basée sur le principe de compétition entre deux antigènes (antigène marqué par une enzyme et antigène non marqué présent dans l'échantillon) vis-à-vis d'anticorps spécifiques recouvrant les puits des microplaques. Le taux d'antigènes marqués liés aux anticorps est inversement proportionnel à la concentration de l'hormone à doser. L'antigène non marqué présent dans l'échantillon déplace une partie des antigènes marqués durant la phase de fixation à l'anticorps. Dans toutes ces réactions, il se crée un équilibre dynamique. Après un lavage qui élimine les anticorps non fixés, les complexes anticorps-antigènes ainsi marqués sont révélés par addition du substrat TMB (tétraméthyl benzidine). L'absorbance mesurée à 450 nm est inversement proportionnelle à la concentration de la progestérone de l'échantillon. Les dosages des échantillons sont réalisés en comparant l'absorbance obtenue pour les échantillons à une courbe d'étalonnage préparée à partir de standards de concentration connue.

➤ Protocole opératoire

Pipeter 50 µl de la solution tampon dans chaque puits de la microplaque.



Pipeter respectivement 50 µl de la solution standard (0- 0,2- 1,0- 8,0- 40 ng/ml), contrôle et échantillon dans les puits de la microplaque.

Pipeter 50 µl du conjugué enzymatique fraîchement préparé dans chaque puits.

Recouvrir la plaque à l'aide d'un film adhésif.

Incuber 60 minutes à l'étuve à 37 °C.

Enlever le film adhésif.

Éliminer le contenu des puits de la microplaque en procédant au lavage 5 temps, 2 cycles avec 300 µl d'eau distillée. Le lavage se fait à l'aide d'un laveur de plaque TECAN Washer Columbus/ Columbus Pro.

Pipeter 100 µl de solution substrat TMB dans chaque puits.

Incuber 15 minutes à température ambiante en obscurité.

Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100µl de solution d'arrêt TMB dans chaque puits.

Lire la densité optique sur l'appareil ELISA TECAN Magellan à 450 nm dans les 30 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt.

➤ **Calcul des résultats**

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

2.2.7. Etude des paramètres immunologiques

2.2.7.1. Etude de la concentration plasmatique en IgG (Whicher *et al.* , 1983)

Les échantillons sanguins recueillis sont centrifugés à 5000 trs/min pendant 5mn. Le dosage des IgG a été réalisé par la méthode d'immunoturbidimétrique.

Principe

Il est basé sur la détermination au point final de la concentration d'IgG par la mesure photométrique d'une réaction antigène-anticorps entre les anticorps anti-IgG présents dans l'échantillon. 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.

La détermination de l'immunoglobuline G (IgG) dans le sérum ou le plasma doit être recueillie soit dans des tubes héparinés ou EDTA. La mesure se fait à l'aide d'un lecteur



OLYMPUS sur une longueur d'onde 570nm, et muni d'un logiciel informatique qui calcule automatiquement la gamme étalon et nous donne directement la valeur à l'unité désirée en utilisant les réactifs suivant :

R1 tampon TRIS : 100mmol/l, pH 7.5 NaCl : 150mmol/l ; Polyéthylène glycol conservateur stabilisant.

R2 tampon TRIS : 100mmol/l, pH8.0 NaCl : 300mmol/l ; conservateur. Anticorps anti-IgG : dépend du titre de l'anti sérum.

Mode opératoire

	Blanc	Echantillon/calibrant
Echantillon/calibrant	-	2 µl
Eau distillée	2 µl	-
Réactif 1	350 µl	350 µl
Mélanger, incubé pendant 3 à 5mn et lire l'absorbance (A1), puis ajouter :		
Réactif 2	70µl	70µl
Mélanger, incubé pendant 3mn et lire l'absorbance (A2).		

La lecture se fait à 570 nm à une température de 37°C contre le blanc réactif.

Calcul

$$\Delta A = (\Delta 2 - \Delta 1) \text{ échantillon / calibrant}$$

2.2.7.2. Etude des cellules du système immunitaire

Le profil hématologique des rattes a été déterminé avant accouplement à l'aide d'un automate d'hématologie (PCE-210 modèle 2009, japon) le sang est prélevé dans des tubes EDTA. Les paramètres du système immunitaire mesurés sont : les globules blancs (GB), les plaquettes(PLT), les lymphocytes (LYM) et les monocytes (MONO).

2.2.8. Etude des paramètres de la ventilation pulmonaire

Le profil hématologique des rattes a été déterminé avant accouplement à l'aide d'un automate d'hématologie (PCE-210 modèle 2009, japon) le sang est prélevé dans des tubes EDTA. Les paramètres de la ventilation pulmonaire mesurés sont : les globules rouges (GR), l'hémoglobine (HGB), hématocrite(HCT).

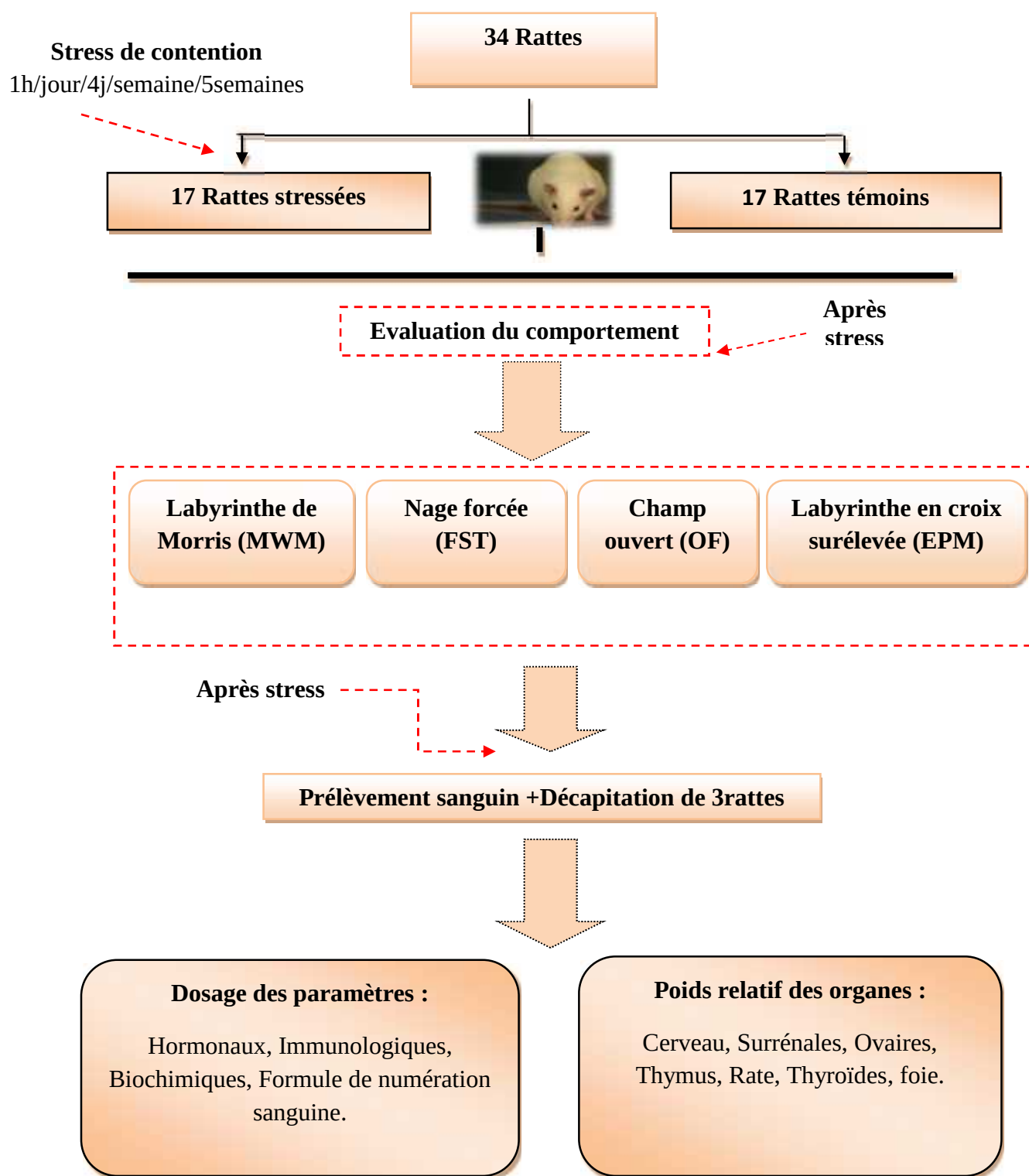


Figure 7. Protocole expérimental (1).



2.2.9. Accouplement

Les rattes sélectionnées pour l'expérimentation (14 rattes témoins et 14 rattes stressées) ont été accouplées conformément aux recommandations de Jadot en 1981 et de Laroche et Rousselet en 1990 à raison de deux rattes pour un rat mâle placés dans une cage pendant 6 jours afin d'augmenter les chances de fécondation. Après l'accouplement, les rattes ont été séparées et suivies jusqu'à la mise-bas.

2.2.10. Etude de l'effet du stress sur les paramètres de la reproduction

Les paramètres de la reproduction chez les rattes des différents lots ont été évalués à partir du taux de fertilité, de fécondité, de productivité numérique, et aussi à partir de la croissance des petits issus des ces deux lots.

2.2.10.1. Taux de fertilité

La fertilité est l'aptitude de la femelle à être fécondée lors d'un œstrus. L'incapacité de cette fonction est appelée infertilité transitoire ou définitive (stérilité).

Taux de fertilité = (Nombre de femelles gestantes / Nombre de femelles mises à la reproduction) x 100.

2.2.10.2. Taux de fécondité

La fécondité est l'aptitude d'une femelle à donner un produit vivant. Au niveau d'un troupeau, on détermine le taux de fécondité.

Taux de fécondité = (Nombre de petits nés vivants / Nombre de femelles mises à la reproduction) x 100

2.2.10.3. Taux de productivité numérique

Il se calcule par la formule : *Taux de productivité numérique* = (Nombre de petits sevrés / Nombre de femelles mises à la reproduction) x 100

Le taux de productivité numérique est étroitement lié au taux de mortalité en croissance et au taux de mortinatalité.

2.2.10.4. Taux de mortalité en croissance

Il se calcule de manière suivante : *Taux de mortalité en croissance* = (Nombre de petits morts avant sevrage / Nombre de petits nés vivants) x 100



2.2.10.5. Taux de mortinatalité

Il est aussi calculé de la manière suivante : Nombre de petits morts nés= (*Taux de mortinatalité / Nombre de petits vivants*) $\times 100$.

2.2.10.6. Sexe ratio (mâles par rapport aux femelles)

C'est le pourcentage de nouveau-nés mâles sur la taille totale de la portée, et calculé selon la formule : sexe ratio= (*nombre de mâles / nombre total de la portée*) $\times 100$.

2.2.11. Etude de l'effet du stress sur la descendance

Au cours de la vie postnatale, le développement neuromoteur, physique, comportemental et cognitif de chaque jeune a été évalué par la mise en place de plusieurs tests (*test de retournement et d'agrippement, test de réaction antigravitaire et de suspension, test du champ ouvert (Open field ; OF), test aquatique de Morris (Morris water maze ; MWM)*). L'évolution du poids corporel de chaque animal a également été mesurée chez les deux sexes. L'effet du stress sur la progéniture a été évalué en deux temps d'après (Vaissaire, 1977) :

Avant sevrage (J1-J25),

Après sevrage (J25-J51),

Tableau 1 : Différents tests appliqués avant et après sevrage chez les rattons mâles et femelles.

Jour	Evénement	
J2, J5, J9, J12, J15, J18	Evolution pondérale des jeunes	Avant sevrage (Avant 25)
J3	Test de retournement	
J4	Test d'agrippement	
J9	Test de réaction antigravitaire	
J12	Test de suspension	
J45	Openfield	Après sevrage (Après 25)
J50 et 51	Labyrinthe aquatique de Morris	



2.2.11.1. Etude de l'effet du stress sur la descendance avant sevrage

Le jour de la naissance a été considéré comme postnatal 1 (PND1). Pour l'étude expérimentale entre la naissance et le sevrage, nous avons utilisé 15 rattons mâles et 15 rattons femelles de chaque lot pour évaluer les différents degrés de maturation développementale et neuromotrice.

2.2.11.1.1. Etude des paramètres de maturation physique des rattons

Parmi les indicateurs du développement physique, nous avons évalué 3 paramètres les plus importants selon Roberts *et al* en 2007 et Da-Silva *et al* en 1991 :

-Poids corporel : Quotidiennement en PND 2, 5, 9, 12, 15, 18. À l'aide d'une balance de précision (BIO BLOCK Scientific).

-Eruption des incisives : Date à laquelle les dents inférieures et supérieures ont d'abord été observées visuellement ou par touche. La vérification a été effectuée entre le 8^{ème} et le 11^{ème} jour après la naissance par simple appréciation visuelle (Leslie *et al*., 2000).

-Ouverture des yeux : la première date à laquelle un ratton a été observé à avoir ouvert ses yeux. La vérification a été effectuée entre le 12^{ème} et le 16^{ème} jour après la mise bas à partir de l'observation des rattons (Leslie *et al*., 2000)

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

2.2.11.1.2. Etude des paramètres de maturation neuromotrice des rattons

-Test de retournement (PND 3) : Egalement connu sous le réflexe de redressement labyrinthique. Il est considéré comme une réflexion de la maturation subcorticale qui corrige l'orientation du corps quand il est retiré de sa position verticale normale. Dans cet essai, les rattons ont été placés sur le dos sur une surface plane et le temps nécessaire pour retrouver leur position sur le ventre (quatre pattes) a été enregistré. Un maximum de 60 secondes par essai (3 essais) a été autorisé. Le réflexe a été considéré comme entièrement réalisé quand les rattons tournent 180° autour de leur axe longitudinal, leurs quatre pattes étant en contact avec la surface (Airman and Sudarsham, 1975 ; ETAP, 2001).

-Test d'agrippement (PND4) : Le jeune rat, placé sur un plateau grillagé, doit s'agripper



pour ne pas tomber lorsque le plateau est mis en rotation. La variable mesurée est l'angle atteint par rapport à l'horizontale lorsque le jeune "décroche" et tombe (mesure du grasping reflex) (ETAP, 2001).

-Test de réaction antigravitaire (PND9) : Cet essai est censé pour examiner le labyrinthe et l'intégration cérébelleuse. Le test consiste à placer les rattons sur un plan incliné à 25 ° et leurs têtes pointés en bas de la pente. La variable mesurée est le temps de latence pour qu'un ratton effectue un demi-tour complet de 180° en se retrouvant la tête vers le haut de la pente (mesure de l'équilibration, maturation du cervelet et des canaux semi-circulaires de l'oreille interne) (Grozier and Pincus, 1926 ; ETAP, 2001).

-Test de suspension (PND12) : Test du développement locomoteur et neuromusculaire. Les pattes antérieures du jeune rat sont amenées au contact d'un fil tendu à 50 cm du sol (2 mm d'épaisseur, 70 cm de longueur, entre les poteaux). Cette stimulation déclenche une réaction d'agrippement et l'animal se suspend au fil. La variable mesurée est la durée de suspension à l'aide d'un chronomètre qui mesure la force musculaire et la "fatigabilité" (ETAP, 2001).

2.2.11.2. Etude de l'effet du stress sur la descendance après sevrage

2.2.11.2.1. Etude des paramètres de maturation comportementale et cognitive des rattons

Au PND 45 et PND (50 et 51) après naissance ; le test du champ ouvert et le test aquatique de Morris ont été utilisés pour la mesure de l'activité locomotrice spontanée et du développement cognitif de la progéniture.

- Activité locomotrice, exploratoire et état émotionnel dans le champ ouvert (Jour 45)

Le test a été basé sur celui de Hall en 1934, il mesure l'activité locomotrice et l'habituation des animaux à un nouvel environnement. Le dispositif se compose d'une base entourée par des parapets en plexiglas dont les mesures sont respectivement de 70cm×70cm×40cm. le plancher est sous forme de carrés de 10cm×10cm de diamètre, il a été divisé en deux zones : zone centrale et zone périphérique dont chacune est de 35cm. L'animal



est placé au centre du dispositif. Son déplacement permet de mesurer le nombre de carrés traversés ainsi que le temps passé dans chaque zone et la séquence est filmée pendant 5 minutes. De ce fait, ce test indique l'activité locomotrice et le comportement anxieux respectivement. Ce dernier est d'autant plus prononcé que le rat passe plus de temps dans la zone périphérique. Quant à la zone centrale, son exploration représente un signe de moindre anxiété. Les paramètres mesurés sont le temps passé dans le centre du dispositif, le temps passé dans la périphérie et la distance parcourue.

-Mémoire spatiale dans le test aquatique de Morris (Jours 50 et 51)

Le test a été basé sur la méthode de Morris en 1981. Le dispositif est fabriqué en polypropylène, circulaire avec un diamètre de 120 cm et une hauteur de 60 cm. Il a été rempli d'eau à une profondeur de 30 cm et la température a été maintenue à $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Le labyrinthe a été divisé en quadrants égaux. Une plateforme d'évasion a été localisée 1 cm au-dessous de la surface de l'eau au centre du quadrant (quadrant cible 3). Des indices géométriques extra-labyrinthe ont été situés autour de la piscine pour fournir une configuration spatiale de la tâche. La durée maximum de chaque épreuve est de 60 secondes. Les animaux qui n'atteignaient pas la plateforme pendant la période fixe ont été guidés et placés par l'expérimentateur puis ont été laissés 30 secondes sur la plateforme. Après l'intervalle inter-trial (30 secondes) pour permettre à la ratte de prendre ses repères spatiaux qui sont indispensables à son orientation dans le dispositif. Les rattons ont été soumis au test durant 2 jours consécutifs.

La première session de test (Jour 50) comporte 5 essais avec une plateforme pour l'acquisition et la familiarisation aux tours desquels l'animal apprend à situer l'emplacement de la plate-forme et à s'y réfugier.

La deuxième session de test (Jour 51) comporte 2 essais sans la plateforme pour la rétention.

Les paramètres à mesurer sont : le temps nécessaire pour trouver la plateforme immergée dans le quadrant désigné comme cible (de latence) et le temps passé dans le même quadrant.



2.2.12. Etude statistique

Mères :

Les résultats sont présentés en $\text{mean} \pm \text{standard error (SEM)}$ et ont été analysés en utilisant le test T de Student avec le programme Minitab (version13) (*poids corporel, poids des organes, EPM, FST, OF, paramètres biochimiques, hormonaux, IgG*).

Le test ANOVA à un critère de classification a été utilisé pour l'analyse de MWM et les *paramètres hématologiques*.

Pour les *paramètres de la reproduction*, nous avons utilisé le test de chi-deux sur Excel office pour comparer les valeurs au-dessous de 100% et le test T de Student pour comparer les valeurs au-dessus de 100%.

La valeur de P inférieur de 0.05 est considérée comme significative.

Descendance :

Les résultats sont présentés en $\text{mean} \pm \text{standard error (SEM)}$, et ont été analysés en utilisant le test T de Student avec le programme Minitab (version13) pour la mesure de la *maturation physique, la maturation neuromotrice des rattons*.

Le test ANOVA à un critère de classification a été utilisé pour l'analyse des *paramètres du test aquatique de Morris et du champ ouvert* entre les groupes stressés et non stressés.

$P < 0.05$ La valeur de P inférieur de 0.05 est considérée comme significative (S.E.M.).

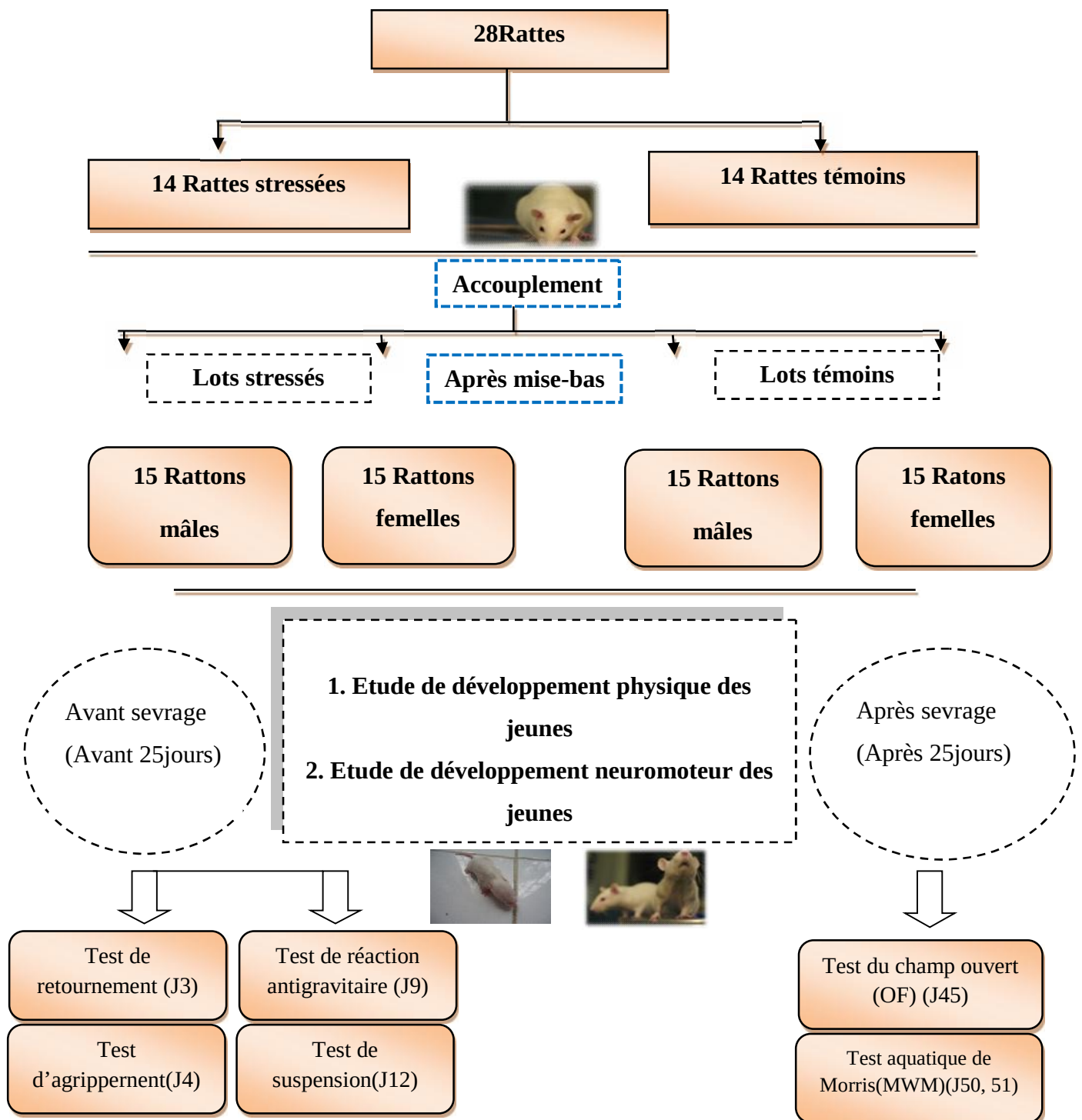


Figure 8. Protocole expérimental (2)



3. RESULTATS

Etude maternelle

3.1. Variation des paramètres pondéraux des rattes

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que la moyenne du poids corporel des rattes témoins à partir de la deuxième semaine (2^{ème} semaine : $182\text{g} \pm 30,3$; 5^{ème} semaine : $217\text{g} \pm 17,5$) est supérieure à celle des rattes stressées (2^{ème} semaine : $165,3\text{g} \pm 40,1$; 5^{ème} semaine : $213,8\text{g} \pm 23,8$).

Par contre nous n'avons constaté aucune différence significative ($p > 0.05$) du poids corporel par rapport à ces deux lots.

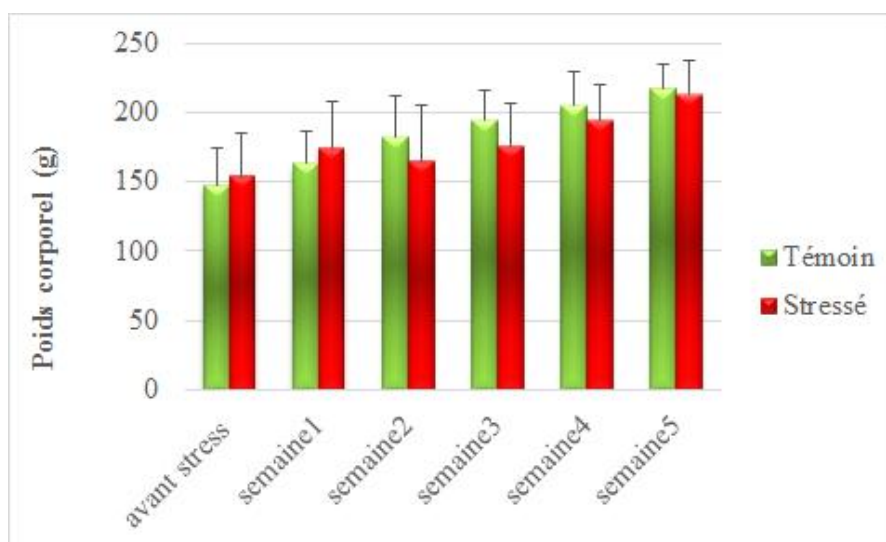


Figure 9. Changement pondéral chez les rattes témoins et stressées.

Les données sont représentées en moyenne (N= 17, témoins, N =17, stressées). (Ns :

Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2. Variation du poids des organes

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que la moyenne du poids relatif du cerveau ($0.51\text{g} \pm 0.06$), de la rate ($0.35\text{g} \pm 0.03$) et du thymus ($0.15\text{g} \pm 0.08$) des rattes stressées sont inférieurs à ceux des rattes témoins : poids relatif du cerveau ($0.72\text{g} \pm 0.04$), de la rate ($0.43\text{g} \pm 0.02$) et du thymus ($0.22\text{g} \pm 0.02$). Alors que le poids relatif des surrénales ($0.026\text{g} \pm 0.005$) et de la thyroïde ($0.033\text{g} \pm 0.005$) des rattes stressées sont supérieurs à ceux des rattes témoins au niveau des surrénales ($0.013\text{g} \pm 0.005$) et de la thyroïde ($0.016\text{g} \pm 0.005$).



Le poids relatif du foie ($3.5g \pm 0.2$) et les ovaires ($0.033g \pm 0.005$) diminuent chez les ratte stressées par rapport aux poids du foie ($3.7g \pm 0.4$) et des ovaires ($0.043g \pm 0.005$) des ratte témoins.

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une diminution significative (* $p < 0.05$) du poids relatif du cerveau, de la rate et de thymus des ratte stressées par rapport aux ratte témoins. Cependant, nous avons constaté une augmentation significative du poids des surrénales (* $p < 0.05$) et de la thyroïde (* $p < 0.05$) chez les ratte stressées par rapport aux ratte témoins. Par contre, nous n'avons remarqué aucune différence significative concernant le poids du foie et des ovaires des ratte stressées par rapport aux ratte témoins ($p > 0.05$).

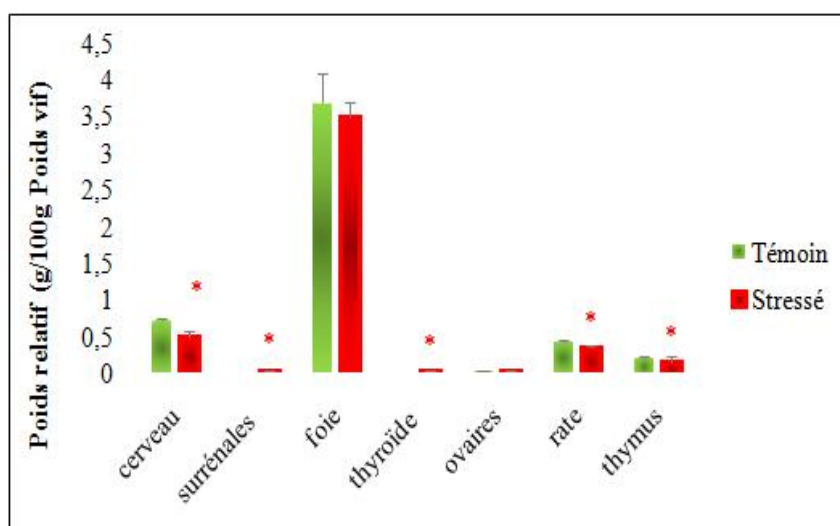


Figure 10. Variation du poids relatif des organes (g/100g Poids vif) des ratte témoins et stressées.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; N témoin=03, N stressé=03). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.3. Variation du comportement

Les quatre tests comportementaux : test du champ ouvert, test du labyrinthe en croix surélevée, test de la nage forcée et test aquatique de Morris ont été utilisés pour l'évaluation comportementale à la fin du protocole du stress.



3.3.1. Test du champ ouvert (Open Field)

Les résultats obtenus dans les **figures 11A, 11B et 11C** montrent une diminution de la distance parcourue chez les rattes stressées (1400cm $\pm$ 170) par rapport aux rattes témoins (1918cm $\pm$ 180), ainsi que les rattes stressées passent moins de temps dans la partie centrale (3.40 s $\pm$ 1.14) et plus de temps dans partie périphérique (260,0s $\pm$ 26,7) du dispositif par rapport au groupe des rattes témoins dans la partie centrale (7.46s $\pm$ 1.33) et dans la partie périphérique (190s $\pm$ 49,3).

L'analyse statistique a montré que la diminution de la distance parcourue par les rattes stressées est hautement significative (** p < 0.01) à celle traversée par les rattes témoins **figure 11A**. Nous avons constaté dans les **figures 11B, 11C** une diminution hautement significative (** p < 0.05) du temps passé au centre chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins et une augmentation significative (*p < 0.05) du temps passé dans la périphérie chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins.

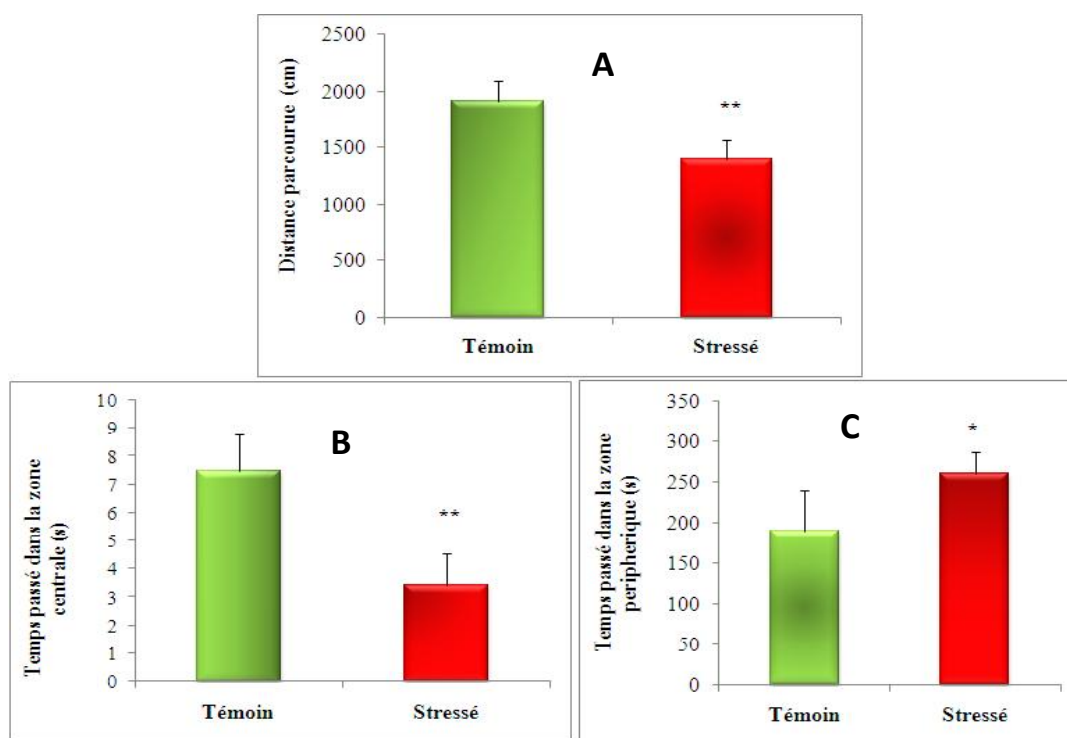


Figure 11. Variation des paramètres du champ ouvert chez les rattes témoins et stressées. La distance parcourue (A). Le temps passé dans la zone centrale (B). Le temps passé dans la périphérie (C). Les données sont représentées en moyenne (m $\pm$ s ; N témoin=17, N stressé=17). (Ns : Différence non significative p > 0.05 ; *p < 0.05 ; **p < 0.01 ; ***p < 0.001).



3.3.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze)

Les résultats obtenus dans la **figure 12B** montrent que le temps passé dans les bras ouverts du dispositif chez les rattes stressées ($9.4s \pm 1.52$) est inférieur à celui des rattes témoins ($19.6 s \pm 7.73$). Par conséquent, les rattes stressées passent beaucoup plus de temps dans les bras fermés ($357 s \pm 25.1$) que chez les rattes témoins ($292.6 s \pm 7.8$) **figure 12D**.

La **figure 12A** montre qu'il y a une diminution du nombre d'entrée dans les bras ouverts et dans les bras fermés **figure 12C** chez les rattes stressées (1.2 ± 0.44 ; 2 ± 1.22) par rapport aux rattes témoins (3.2 ± 1.3 ; 5.4 ± 1.14).

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une diminution significative ($*p < 0.05$) du temps passé dans les bras ouverts du dispositif chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 12B**. Et par conséquent une augmentation très significative ($***p < 0.001$) du temps passé dans les bras fermés chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 12D**.

Concernant le nombre d'entrée dans les bras ouverts et dans les bras fermés, nous avons remarqué qu'il y a une diminution significative ($*p < 0.05$) dans les bras ouverts et hautement significative ($**p < 0.001$) dans les bras fermés chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 12A, 12C**.

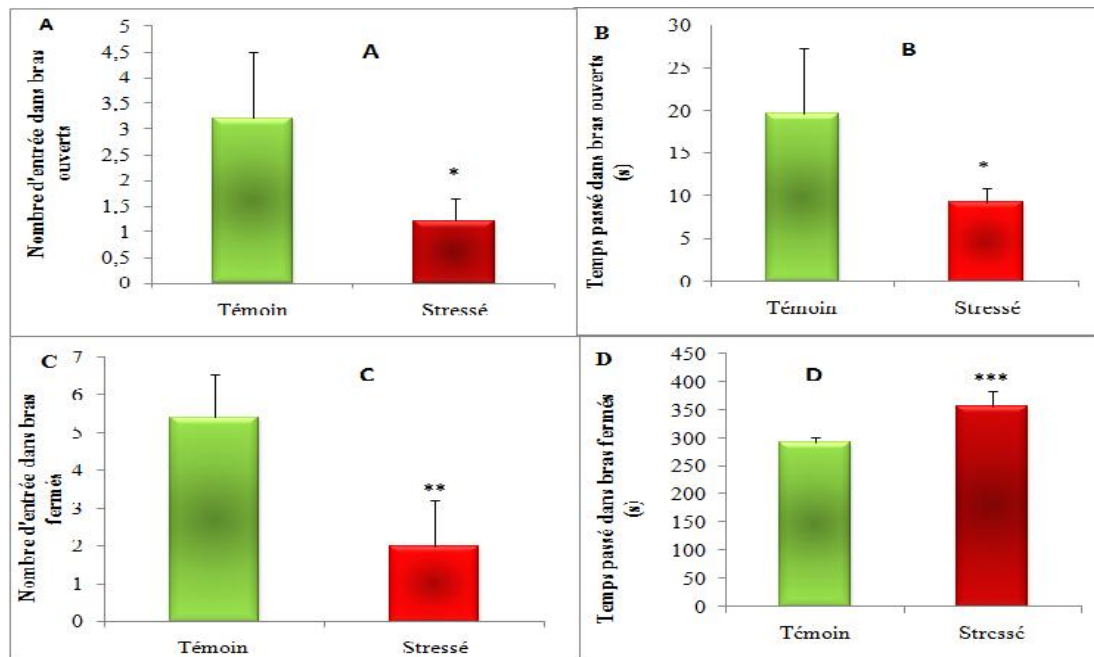


Figure 12. Variation des paramètres du labyrinthe en croix surélevée chez les rattes témoins et stressées.

Le nombre d'entrée dans les bras ouverts (A). Le nombre d'entrée dans les bras fermés (C).

Le temps passé dans les bras ouverts (B). Le temps passé dans les bras fermés (D).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns :

Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.3.3. Test aquatique de Morris (Morris water maze)

Les résultats obtenus dans la **figure 13** montrent que le nombre d'entrée **figure 13A** (j3 : $12.64s \pm 4.33$; j4 : $8.72s \pm 3.98$) ainsi que le temps passé dans le quadrant cible **figure 13B** (j3 : $20.5s \pm 2.08$; j4 : $14.5s \pm 3.11$) au troisième (apprentissage) et au quatrième (mémorisation) jours chez les rattes stressées sont inférieurs au nombre d'entrée (j3 : $21.3s \pm 4.52$; j4 : $16.30s \pm 4.38$) et au temps passé (j3 : $25.75s \pm 1.71$; j4 : $25.25s \pm 5.56$) chez les rattes témoins.

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une diminution significative (* $p < 0.05$) du nombre d'entrée **figure 13A** et du temps passé **figure 13B** dans le quadrant cible au troisième (apprentissage) et au quatrième (mémorisation) jours chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins.

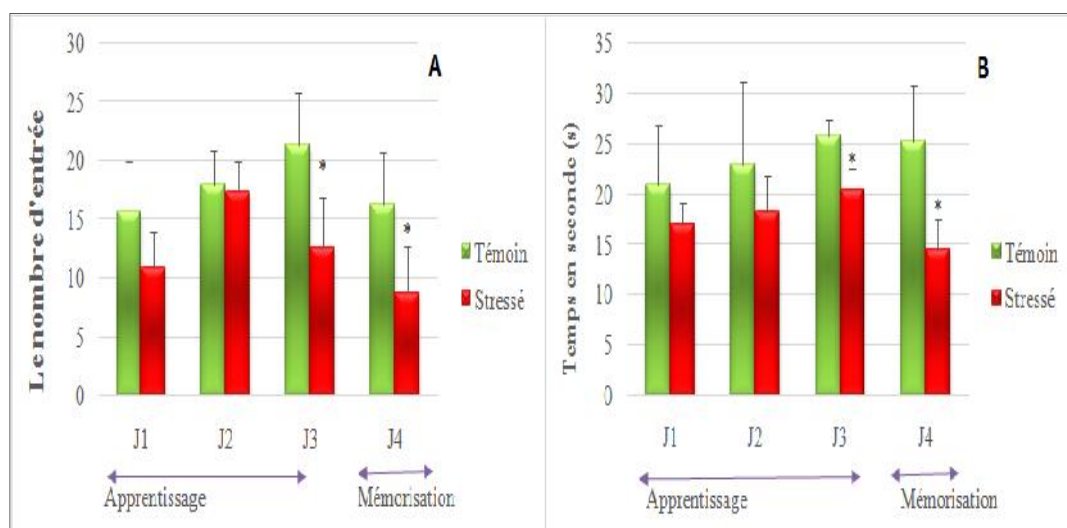


Figure 13. Variation des paramètres du test aquatique de Morris chez les ratte témoins et stressés.

(A) le nombre d'entrée dans le quadrant cible. (B) le temps passé dans le quadrant cible. Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.3.4. Test de la nage forcée (Forced swimming test)

Les résultats obtenus dans la **figure 14** montre une augmentation du temps d'immobilité chez les ratte stressés ($214.6s \pm 21.8$) par rapport aux ratte témoins ($169.6s \pm 33.7$), par contre nous n'avons pas constaté de différence significative dans le temps d'escalade ($211.6s \pm 15.8$) et dans le temps de la nage ($130.2s \pm 24.4$) chez les ratte stressés en comparaison avec les ratte témoins pour le temps d'escalade ($228.6s \pm 16.3$) et le temps de la nage ($158.6s \pm 23.4$).

L'analyse statistique a montré que l'augmentation du temps d'immobilité est significative (* $p < 0.01$) chez les ratte stressés par rapport aux ratte témoins. Nous n'avons constaté aucune différence significative ($p > 0.05$) du temps de la nage et du temps d'escalade chez les ratte stressés en comparaison avec les ratte témoins **figure 14**.

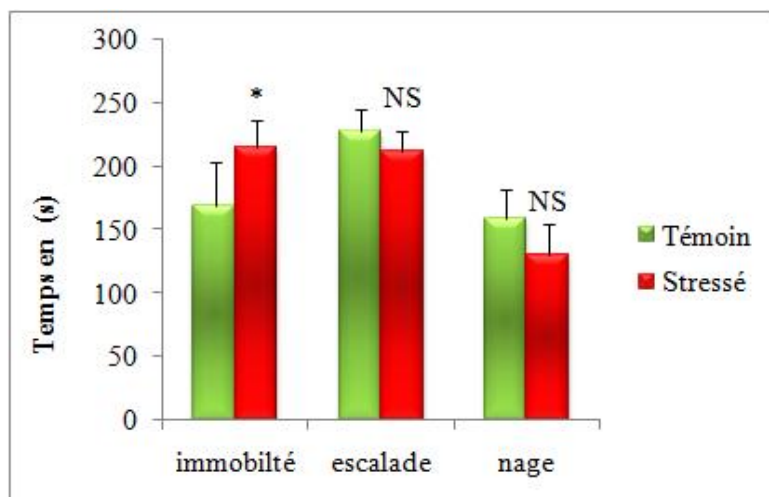


Figure 14. Variation des paramètres de la nage forcée chez les rattes témoins et stressées.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.4. Variation des paramètres biochimiques

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré dans la **figure 15** que la moyenne de la glycémie a augmenté dans la quatrième ($1.19\text{g/l} \pm 0.02$) et la cinquième semaine ($1.34\text{g/l} \pm 0.04$) du stress de contention chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins dans la quatrième ($0.87\text{g/l} \pm 0.08$) et la cinquième semaine ($0.98\text{g/l} \pm 0.04$).

D'après la **figure 16**, les résultats ont montré que la moyenne du cholestérol a diminué après la cinquième semaine du stress de contention chez les rattes stressées ($1.21\text{g/l} \pm 0.021$) par rapport aux rattes témoins ($1.50\text{g/l} \pm 0.16$).

Cependant nous avons constaté d'après la **figure 17** que la moyenne des triglycérides a augmenté après la cinquième semaine du stress de contention chez les rattes stressées ($0.93\text{g/l} \pm 0.026$) par rapport aux rattes témoins ($0.80\text{g/l} \pm 0.18$).

L'analyse statistique a montré qu'il y a une augmentation significative (* $p < 0.05$) de la glycémie à partir de la quatrième semaine du stress chronique de contention chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 15**.

Cependant, nous avons constaté après le stress de contention une diminution hautement significative (** $p < 0.01$) du cholestérol chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 16**.



Par contre, nous avons remarqué après le stress de contention une augmentation hautement significative (** $p < 0.01$) des triglycérides chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 17**.

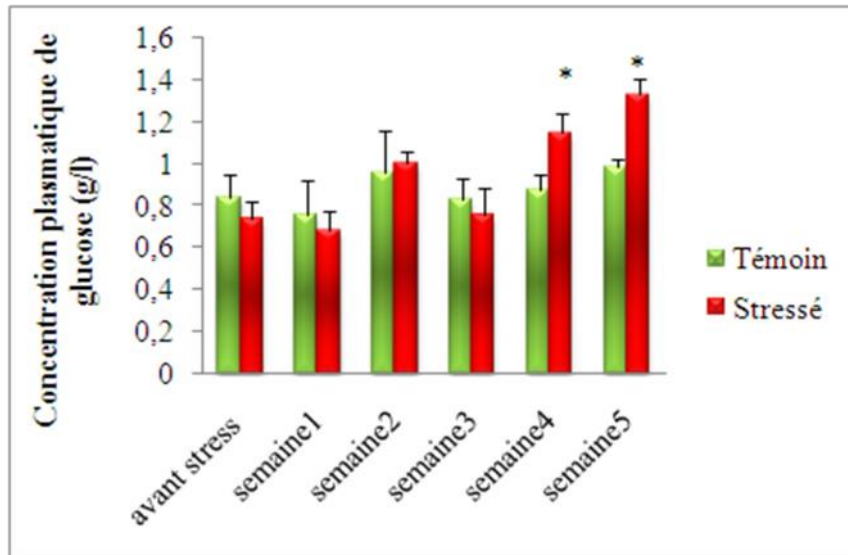


Figure 15. Variation du taux de glucose plasmatique (g/l).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

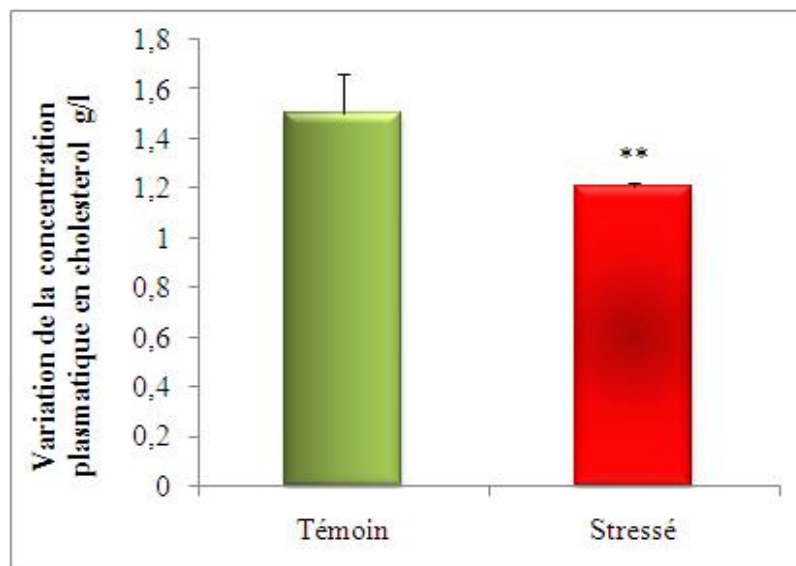


Figure 16. Variation de la concentration plasmatique du cholestérol (g/l).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

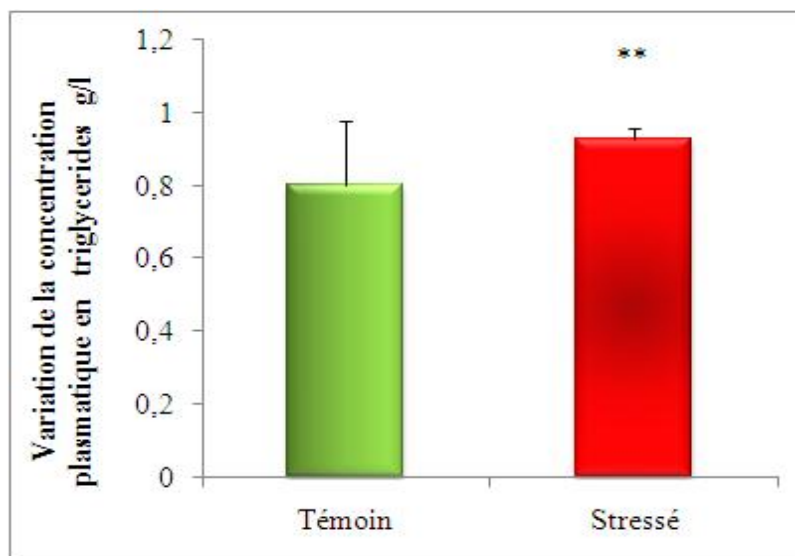


Figure 17. Variation du taux des triglycérides (g/l).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.5. Variation des paramètres hormonaux

3. 5.1. Variation de la progestérone plasmatique (ng/ml)

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que la moyenne de la progestérone des ratte stressées est supérieure ($74,83 \text{ ng/ml} \pm 9,16$) à celle des ratte témoins ($46,09 \text{ ng/ml} \pm 7$).

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une augmentation hautement significative (** $p < 0.01$) de la progestérone des ratte stressées par rapport aux ratte témoins **figure 18**.

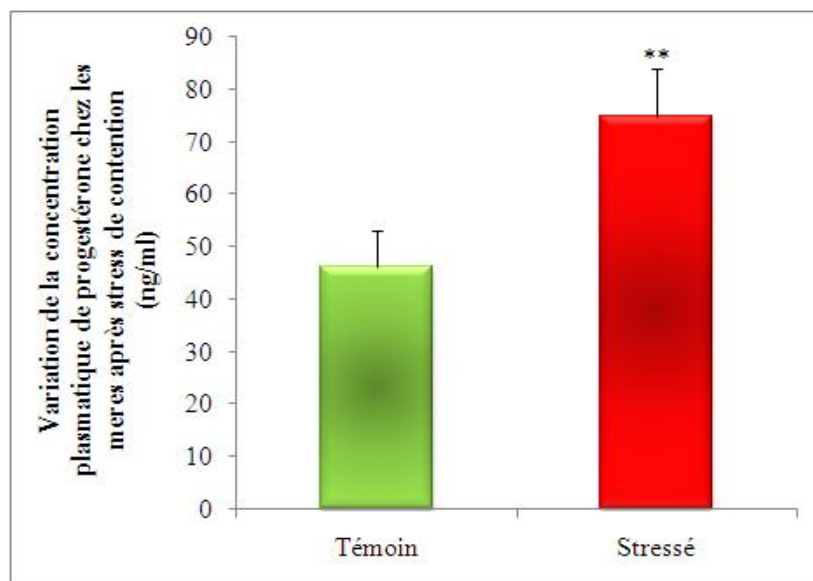


Figure 18. Variation de la concentration plasmatique en progestérone (ng/ml).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns :

Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.6. Variation des paramètres immunologiques

3.6.1. Variation de la concentration plasmatique en IgG (g/l)

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré que la moyenne des IgG des rattes stressées est supérieure ($4,36 \text{ g/l} \pm 0,06$) à celle des rattes témoins ($3,35 \text{ g/l} \pm 0,12$).

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une augmentation hautement significative (** $p < 0.01$) des IgG plasmatique des rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 19.**

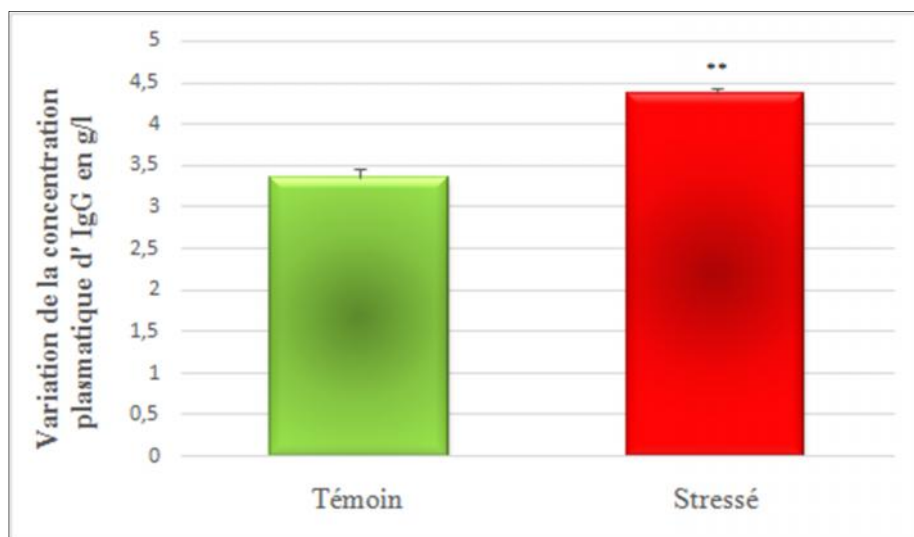


Figure 19. Variation de la concentration plasmatique des IgG (g/l).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns :

Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.6.2. Variation des cellules du système immunitaire

Les cellules immunitaires se divisent en cellules de l'immunité innée (GB, MONO, PLQ) qui sont capables de capter, de présenter l'antigène et de détruire les éléments étrangers et en cellules de l'immunité adaptative (LYMPH) **figure 20**.

Les résultats montrent une diminution du taux des globules blancs ($8.22 \mu l \pm 0.60$) et des monocytes ($0,57 \mu l \pm 0.12$) des rattes stressées par rapport aux taux des globules blancs ($9.56 \mu l \pm 1.28$) et des monocytes ($0,86 \mu l \pm 0.10$) des rattes témoins. Par contre, nous n'avons pas trouvé de différences dans le taux des lymphocytes ($5.63 \mu l \pm 0.77$) et des plaquettes ($705.33 \mu l \pm 138.16$) des rattes stressées par rapport aux taux des lymphocytes ($5.89 \mu l \pm 0.84$) et des plaquettes ($599 \mu l \pm 124.30$) des rattes témoins.

L'analyse statistique a démontré une diminution significative du taux des globules blancs et des monocytes chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins (* $p < 0.05$). En revanche, le taux des lymphocytes et des plaquettes ne présentent aucune différence significative chez les rattes stressées en comparaison avec les rattes témoins ($p > 0.05$) **figure 20**.



Figure 20. Variation des cellules du système immunitaire inné et adaptative chez les ratte témoins et stressés.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.7. Variation des paramètres de la ventilation pulmonaire

Les résultats obtenus montrent une diminution du taux des globules rouges ($6.35 \mu l \pm 1.16$), de l'hémoglobine ($13.9 \mu l \pm 0.61$) et de l'hématocrite ($36.02 \mu l \pm 2.18$) des ratte stressées par rapport aux taux des globules rouges ($8.33 \mu l \pm 0.51$), de l'hémoglobine ($16.81 \mu l \pm 0.87$) et de l'hématocrite ($44.72 \mu l \pm 1.29$) ratte témoins.

L'analyse statistique a démontré une diminution hautement significative des globules rouges et de l'hématocrite (** $p < 0.01$), et une diminution très significative de l'hémoglobine (*** $p < 0.01$) chez les ratte stressées par rapport aux ratte témoins **figure 21**.

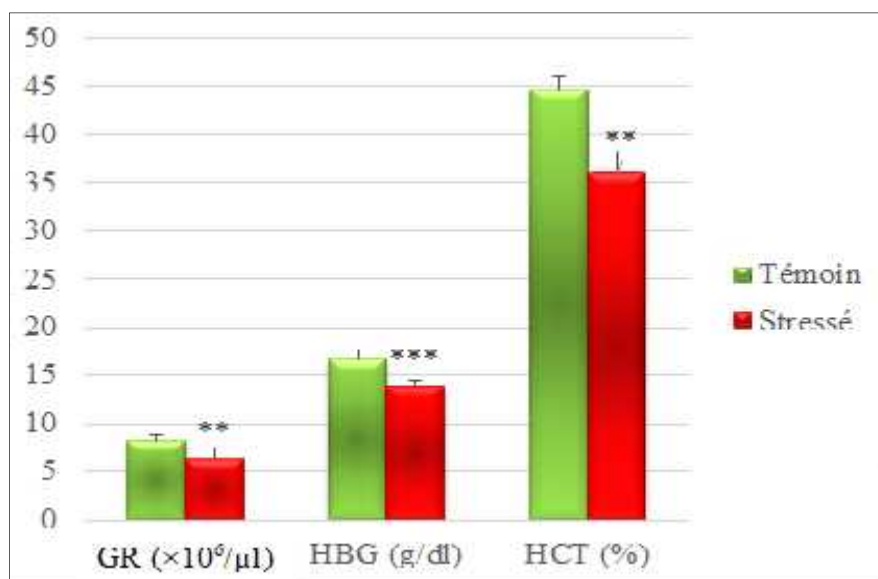


Figure 21. Variation des paramètres de la ventilation pulmonaire chez les rattes témoins et stressées.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=17, n stressé=17). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.8. Variation des paramètres de la reproduction

Les résultats obtenus montrent une diminution du taux de fertilité (50 %), fécondité (485.714%) et de productivité numérique (435.714%) chez les rattes stressées par rapport aux taux de fertilité (100%), fécondité (550%) et de productivité numérique (550%) des rattes témoins.

L'analyse statistique démontre une diminution hautement significative du taux de fertilité (** $p < 0.01$), une diminution très significative du taux de fécondité et de productivité numérique (*** $p < 0.01$) chez les rattes stressées par rapport aux rattes témoins **figure 22**.

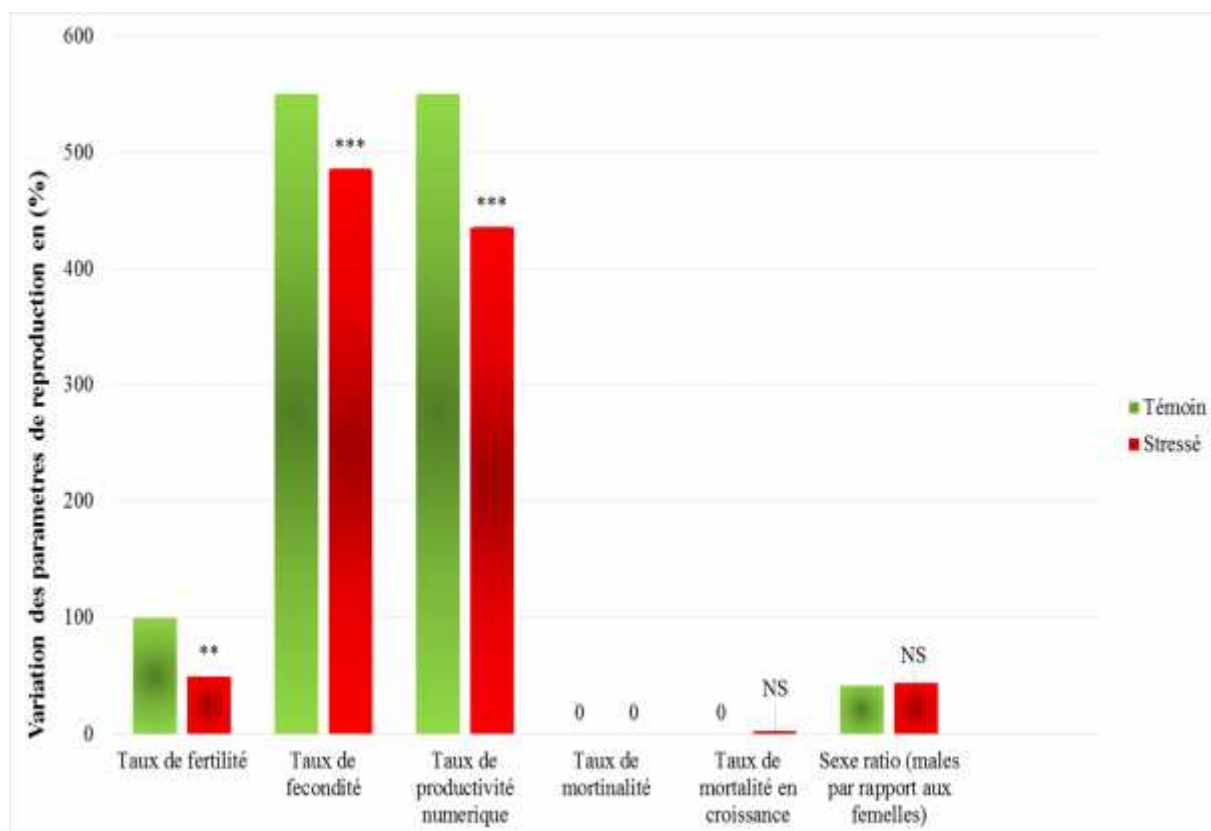


Figure 22. Variation des paramètres de la reproduction chez les rattes témoins et stressées.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n témoin=14, n stressé=14). (Ns :

Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)



Etude de la descendance

3.2.1. Effets du stress sur la descendance avant sevrage

3.2.1.1. Variation des paramètres de maturation physique des rattons

3.2.1.1.1. Poids corporel

Les résultats obtenus chez les rattons après la naissance montrent une augmentation du poids corporel des rattons femelles **figure 23 A** issues des mères stressées (PND2 : $6,23\text{g} \pm 0,49$; PND5 : $8,46\text{g} \pm 1,22$; PND9 : $12,82\text{g} \pm 0,79$; PND18 : $22,32\text{g} \pm 2,67$) par rapport aux rattons femelles issus des mères témoins (PND2 : $5,8\text{g} \pm 0,46$; PND5 : $7,61\text{g} \pm 0,42$; PND9 : $9,47\text{g} \pm 1,41$; PND18 : $20,35\text{g} \pm 2,13$).

Les rattons mâles **figure 23 B** issus des mères stressées montrent une augmentation du poids corporel (PND2 : $6,33\text{g} \pm 0,62$; PND5 : $8,59\text{g} \pm 1,1$; PND9 : $13,25\text{g} \pm 0,69$) en comparaison avec les rattons mâles issus des mères témoins (PND2 : $5,9\text{g} \pm 0,48$; PND5 : $7,64\text{g} \pm 0,65$; PND9 : $10,09\text{g} \pm 1,85$).

En revanche, nous ne constatons aucune différence de poids au niveau des deux sexes chez les rattons stressés par rapport aux témoins.

L'analyse statistique a démontré une augmentation hautement significative (** $p < 0.01$) au PND2 et très significative (***) $p < 0.01$) au PND5, PND9 chez les rattons femelles issus des mères stressées par rapport aux rattons femelles issus des mères témoins (** $p < 0.01$) **figure 23 A**. Une augmentation significative (* $p < 0.01$) au PND2, hautement significative (** $p < 0.01$) et très significative (***) $p < 0.01$) au PND9 chez les rattons mâles issus des mères stressées par rapport aux rattons mâles issus des mères témoins **figure 23 B**.

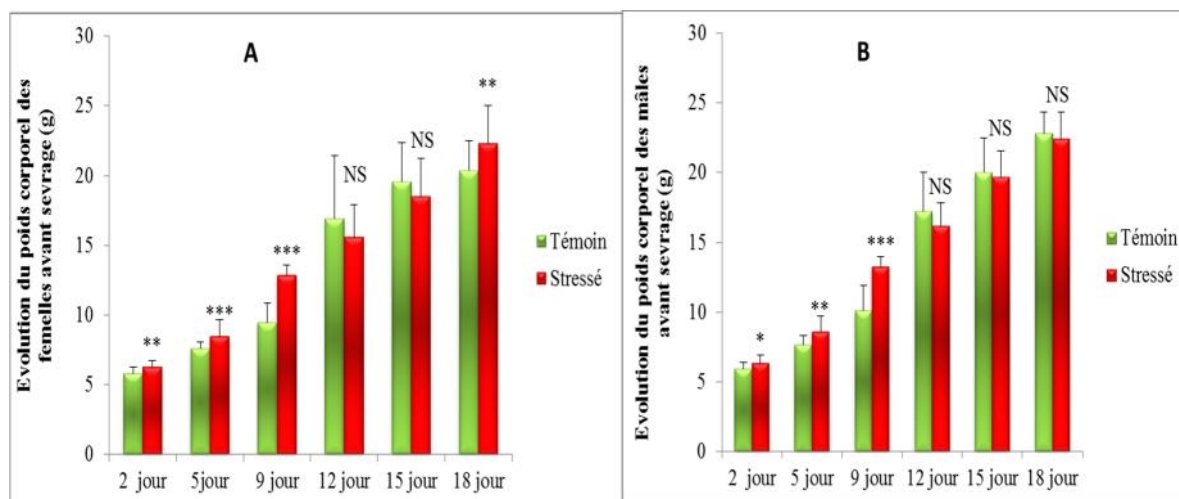


Figure 23. Poids corporel des rattons femelles (A) et des rattons mâles (B) entre PND 2 et PND18.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

3.2.1.1.2. Eruption des incisives et ouverture des yeux

Les résultats obtenus dans la **figure 24 A** montrent une augmentation légère dans les jours d'ouverture des yeux des rattons mâles stressés (15.66 ± 0.48) par rapport aux rattons mâles témoins (15.37 ± 0.51). Par contre, nous n'avons constaté aucune différence entre les femelles issues des mères stressées (15.39 ± 0.49) et les femelles issues des mères témoins (15.38 ± 0.5).

Les résultats obtenus dans la **figure 24 B** montrent une augmentation légère dans les jours d'apparition des incisives des rattons stressés ; mâles (10.81 ± 0.4) et femelles (10.64 ± 0.49) par rapport aux rattons mâles témoins (10.63 ± 0.49) et femelles témoins (10.44 ± 0.5).

L'analyse statistique ne montre aucune différence significative entre les lots dans la date d'ouverture des yeux **figure 24 A** et la date d'apparition des incisives **figure 24 B** ($p > 0.05$).

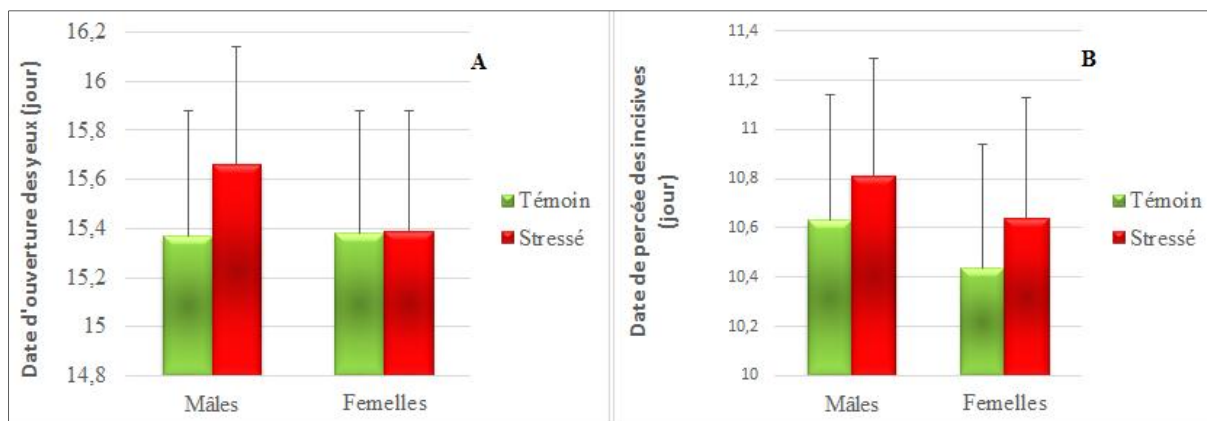


Figure 24. Percée des incisives (A) et ouverture des yeux (B) des rattons mâles et femelles.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2. Variation des paramètres de maturation neuromotrice des rattons

3.2.1.2.1. Test de retournement (PND3)

Dans ce test, nous avons constaté une augmentation du temps nécessaire chez les mâles stressés ($20.42s \pm 5.31$) par rapport aux mâles témoins ($12.56s \pm 1.33$) et une augmentation du temps chez les femelles stressées ($48.66s \pm 9.95$) par rapport aux femelles témoins ($19.5s \pm 3.44$) dans le temps nécessaire pour récupérer leur position normale (180° autour de leur axe longitudinal), les témoins prennent moins de temps pour se tenir sur leurs quatre pattes.

L'analyse statistique montre une augmentation très significative (** $p < 0.001$) du temps nécessaire pour récupérer la position normale chez les deux sexes des deux lots **figure 25**.

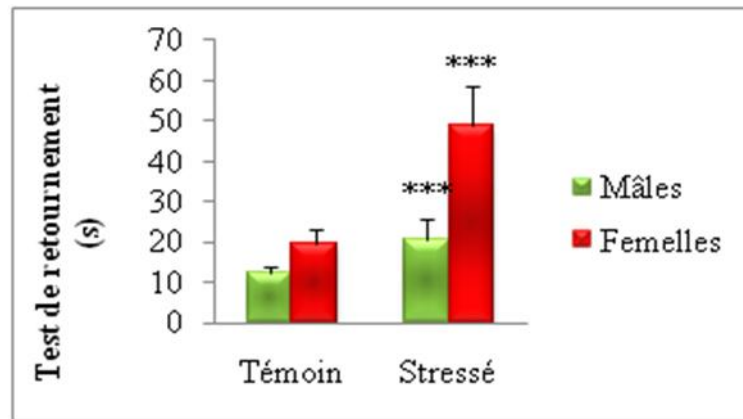


Figure 25. Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test de retournement (PND3).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles).

(Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2.2. Test d'agrippement (PND4)

Les résultats montrent une diminution de l'angle atteint chez les rattons mâles ($91.3^\circ \pm 5.21$) et les rattons femelles ($90.56^\circ \pm 4.9$) issus des mères stressées par rapport aux rattons mâles ($98.33^\circ \pm 3.7$) et les rattons femelles ($96.86^\circ \pm 5.95$) issus des mères témoins.

L'analyse statistique démontre une diminution très significative (*** $p < 0.001$) entre les rattons mâles et hautement significative (** $p < 0.001$) entre les rattons femelles. Les rattons stressés décrochent et tombent rapidement **figure 26**.

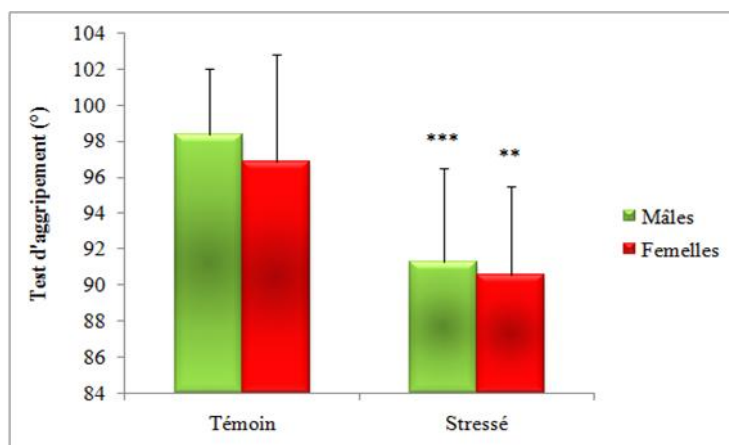


Figure 26. Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test d'agrippement (PND4).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2.3. Test de réaction antigravitaire (PND9)

Dans ce test, nous avons constaté une augmentation du temps de latence pour se tourner et effectuer un demi-tour complet de 180° (se retrouvant la tête vers le haut de la pente inclinée à 25°) chez les mâles stressés ($22s \pm 1.66$) par rapport aux mâles témoins ($13.77s \pm 3.13$). Une augmentation du temps chez les femelles issues des mères stressées ($25.36s \pm 1.71$) par rapport aux femelles issues des mères témoins ($13.55s \pm 4.12$).

L'analyse statistique montre une augmentation très significative (*** $p < 0.001$) du temps nécessaire pour récupérer la position normale chez les deux sexes des deux lots **figure 27**.

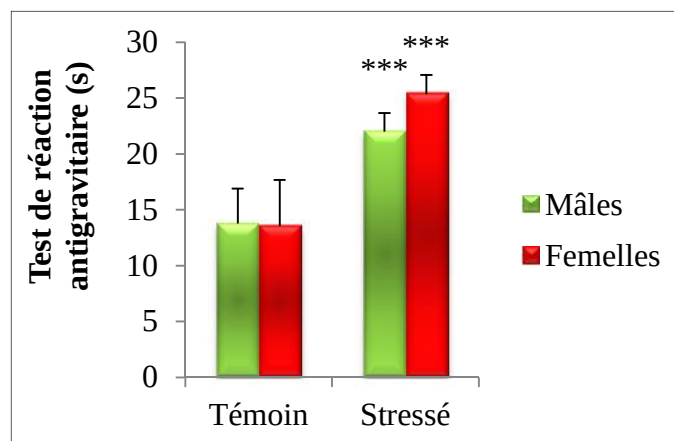


Figure 27. Effets du stress sur le comportement des rattons mâles et femelles. Test de réaction antigravitaire (PND9).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères femelles témoins (15mâles, 15femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2.4. Test de suspension (PND12)

C'est le test de développement neuromusculaire et locomoteur. Dans ce test, nous avons observé une diminution de la durée de suspension au niveau de la tige horizontale chez les rattons mâles ($14.72s \pm 3.1$) et les rattons femelles ($14.57s \pm 2.77$) issus des mères stressées par rapport aux rattons mâles ($16.19s \pm 1.95$) et aux rattons femelles ($19.56s \pm 1.42$) issus des mères témoins.

L'analyse statistique démontre une diminution significative (* $p < 0.001$) du temps de suspension des rattons mâles stressés par rapport aux rattons mâles témoins. Une diminution très significative (*** $p < 0.001$) entre les rattons femelles stressées par rapport rattons femelles témoins **figure 28**.

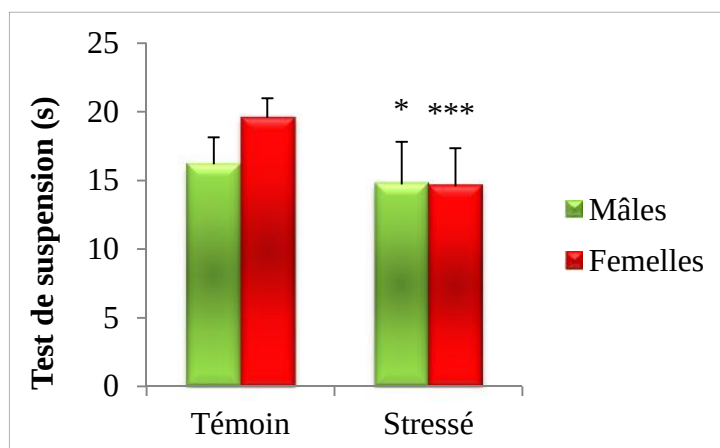


Figure 28. Effets du stress sur le comportement des ratons mâles et femelles. Test de suspension (PND12).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n ratons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n ratons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2. Effets du stress sur la descendance après sevrage

3.2.1.2.1. Variation des paramètres de maturation comportementale et cognitive des ratons

3.2.1.2.1.1. Test du champ ouvert (Open Field test)

Les résultats obtenus dans ce test montrent une légère diminution du temps passé au centre du dispositif **figure 29A** chez les lots stressés : mâles ($5s \pm 1.17$) et femelles ($5.1s \pm 1.25$) par rapport aux lots témoins : mâles ($5.3s \pm 1.14$) et femelles ($5.2s \pm 1.26$). Par contre, Les ratons issus des mères stressées **figure 29B** présentent une hyperactivité dans le test du champ ouvert, constatée par l'augmentation de la distance parcourue chez les ratons femelles ($1535cm \pm 51.7$) et les ratons mâles ($1508.3cm \pm 82.9$) par rapport aux ratons témoins : mâles ($1186.7cm \pm 59.9$) et femelles ($1196cm \pm 35.6$).

L'analyse statistique ne montre aucune différence significative du temps passé au centre du dispositif **figure 29A** ($p > 0.05$). Cependant, nous avons constaté une différence très significative chez les deux sexes des deux lots ; témoin et stressé (*** $p < 0.001$) **figure 29**.

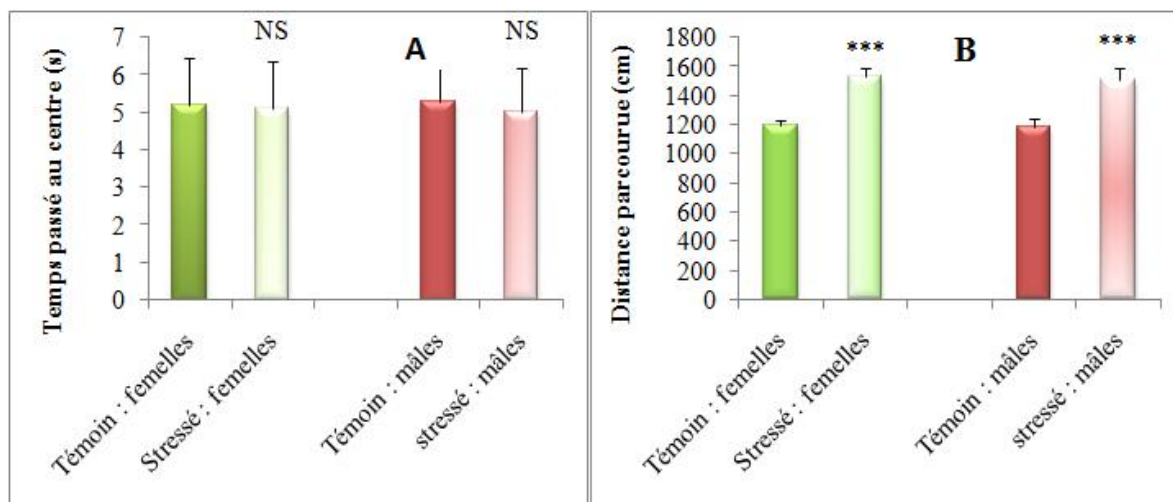


Figure 29. Effets du stress chronique de contention sur le comportement des rats évalué dans le test de l'Open field. (A,B) représentent respectivement la distance parcourue et le temps passé dans le centre du dispositif à l'âge de 45 jours.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n rattons issus des mères pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n rattons issus des mères témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3.2.1.2.1.2. Test aquatique de Morris (MWM)

Dans les deux jours du test aquatique de Morris, nous avons constaté des différences remarquables dans le temps de latence pour trouver la plateforme submergée et le temps passé dans le quadrant cible 3 mais aucune différence observée au PND 50 **figure 30** et au PND 51 **figure 31** entre les groupes issus des mères pregestationnellement stressées et témoins.

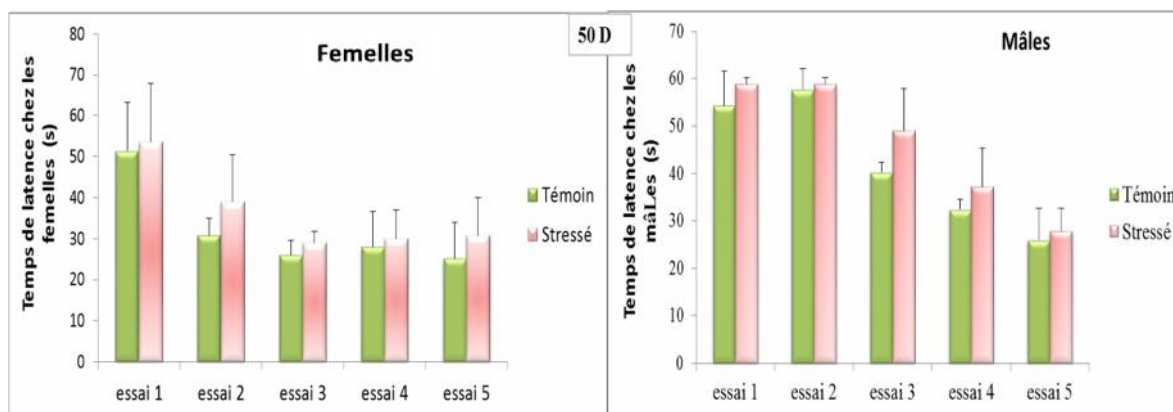


Figure 30. Temps de latence de la plateforme submergée à travers toutes les épreuves en PND 50 dans le quadrant cible 3 chez les ratons mâles et femelles.

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n ratons issus des femelles pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n ratons issus des mères femelles témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

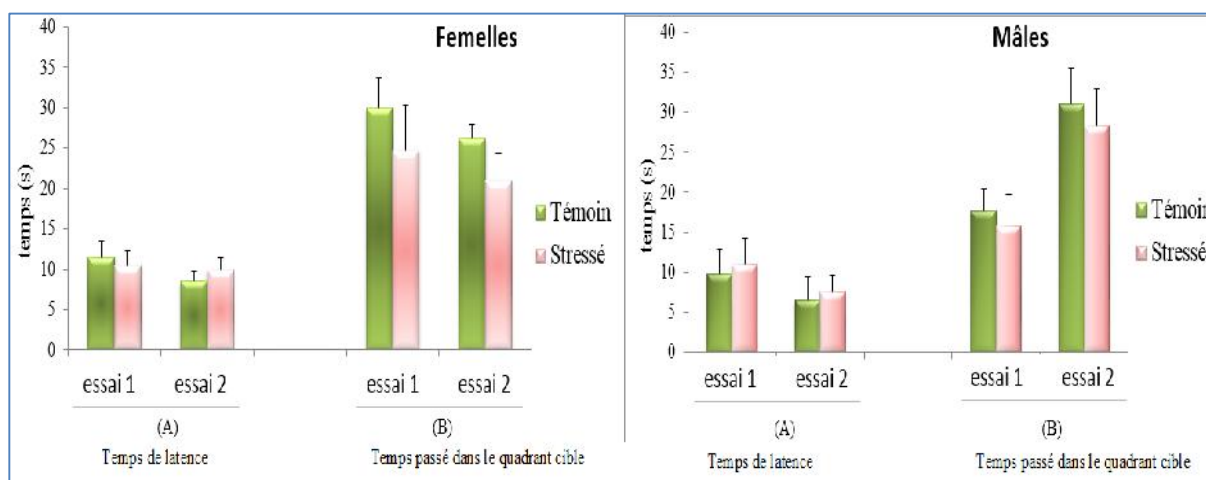


Figure 31. Temps de latence dans le quadrant cible 3 en PND 51 chez les ratons mâles et femelles (A). Temps passé dans le même quadrant chez les ratons mâles et femelles (B).

Les données sont représentées en moyenne ($m \pm s$; n ratons issus des mères pregestationnellement stressées (15 mâles, 15 femelles) et n ratons issus des mères témoins (15 mâles, 15 femelles). (Ns : Différence non significative $p > 0.05$; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).



4. DISCUSSION

Les mères

De nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre les différents facteurs de vie, contribuant dans le développement de l'anxiété, l'apparition de la dépression (Pardon *et al.*, 2000 ; Gronli *et al.*, 2005 ; Brittney *et al.*, 2011 ; Shuichi *et al.*, 2012) et la perturbation de la reproduction (Saraswathi *et al.*, 2010). En cas de stress chronique, des modifications morphologiques peuvent apparaître et le poids corporel peut être un indice intéressant des capacités de riposte de l'animal (Selye, 1976). L'application chronique ou répétée d'un stresser entraîne une diminution du gain du poids (Armario *et al.*, 1990 ; Ricart-Jane *et al.*, 2002). Le même résultat a été évoqué par Bardin *et al.* (2009) en appliquant le même type de stress. Pendant la réalisation de notre protocole, nous avons constaté une perturbation de la prise alimentaire chez le lot stressé comparativement au lot témoin (Rojo *et al.*, 2006 ; Torres and Nowson, 2007 ; Lo Sauro *et al.*, 2008). La modification du poids corporel ainsi que de la prise alimentaire indiquent évidemment que le stress est devenu une partie intégrale de la vie quotidienne (Bowers *et al.*, 2008 ; Frick *et al.*, 2009). Cependant, l'exposition au stress chronique peut apporter des conséquences nuisibles au cerveau et confère la susceptibilité à certains désordres émotionnels (Fernandez *et al.*, 2010). Citons que la diminution du poids corporel est l'un des symptômes dépressifs (Klerman and Weissman, 1988), les différences des poids observées au cours de cette expérimentation peuvent soulever l'hypothèse abordée par (Strekalova *et al.*, 2004) qui met en avant une prise alimentaire plus faible consécutive à une dépression. Les lots stressés sont en anhedonisme indiquant l'installation d'une anxiété en réponse au traitement. L'augmentation du poids corporel à la fin du protocole (quatrième et cinquième semaine du stress peut être en relation avec l'hypertriglycémie préparant l'individu au diabète (rat avec glycémie supérieure à 9 mmol/l est considéré comme hyperglycémie) (Fuhlendorff *et al.*, 1998).

Le stress engendre également des modifications comportementales et il serait responsable chez l'homme de nombreux troubles psychiatriques tels que la dépression ou les troubles liés à l'anxiété (Garcia-Bueno *et al.*, 2008). Des études récentes ont montré que le stress de contention induit un comportement anxieux et dépressif chez les rongeurs (Haenisch *et al.*, 2009 ; Hageman *et al.*, 2009; Huynh *et al.*, 2011; Regenthal *et al.*, 2009 ; Shuichi *et al.*, 2012). En revanche, d'autres études n'ont pas trouvé de tels changements après le stress de contention (Gregus *et al.*, 2005; Swiergiel *et al.*, 2007). Le stress peut aussi influencer l'agressivité (Barreto-Medeiros *et al.*, 2007 ; Veenema and Neumann, 2007) et il induit notamment une augmentation du niveau d'anxiété évalué dans le test du champ ouvert. La



réduction de la distance parcourue dans le dispositif chez les rattes stressées indique une diminution de l'activité exploratrice caractéristique d'un niveau d'anxiété plus élevé chez les rattes (Schmitt and Hiemke, 1998 ; Prut and Belzung, 2003). L'augmentation du temps passé dans la zone externe et la diminution du temps passé dans la zone interne du champ ouvert indique une diminution de la motivation à explorer un nouvel environnement, due à une augmentation du niveau d'anxiété des rattes stressés (Katz *et al.*., 1987 ; Tobach, 1966).

Nous avons aussi enregistré dans cette expérimentation une diminution du temps passé dans les bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevée (EPM) et une augmentation du temps d'immobilité des rattes dans le test de la nage forcée (FST). Les résultats de l'EPM suggèrent une augmentation du comportement anxieux ainsi l'augmentation de l'immobilité dans le FST indique un comportement de désespoir aggravé, ce qui est sans aucun doute expliqué par un dérèglement au niveau des systèmes de régulation induit par le stress chronique de contention (CRS). Le stress génère donc des modifications comportementales et il serait responsable chez l'homme selon des études réalisées de beaucoup de désordres psychiatriques comme la dépression et l'anxiété (Garcia-Bueno *et al.*., 2008 ; Horstmann and Binder, 2011). Le stress chronique de contention induit un comportement anxieux et dépressif chez les rongeurs (Huynh *et al.*., 2011; Cliona *et al.*., 2011; Shuichi *et al.*., 2012) et une diminution du nombre d'entrée dans les bras ouverts indique une diminution de l'activité motrice générale (Brummelte *et al.*., 2012), ce qui est en accord avec nos résultats. Cependant, d'autres études n'ont pas confirmé de tels changements suite au CRS (Gregus *et al.*., 2005 ; Swiergiel *et al.*., 2007) mais la contradiction dans les résultats pourrait être attribuée à la durée du CRS, aux procédures expérimentales (e.g., jour-nuit ; la méthode de l'application du stress) , aux facteurs génétiques et au sexe de l'animal (Huynh *et al.*., 2011). Hauber Gameiro *et al.* en 2006 n'a pas trouvé de telles différences entre les protocoles concernant l'apparition de l'anxiété quand il avait fait une comparaison entre le stress aigu, subchronique et chronique. Cependant, ils peuvent tous induire des niveaux significatifs d'anxiété dans le test de l'EPM.

Le stress est une expérience inévitable dans la vie qui peut perturber les processus cognitifs et la neuroplasticité. Dans notre étude, les rattes soumises au stress chronique de contention montrent une augmentation significative du temps de latence avec diminution du temps passé dans le quadrant cible dans le test aquatique de Morris. Ces derniers sont expliqués par la perturbation et les affaiblissements des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Xu *et al.*., 2009).



Les modèles de stress chronique de contention sont les plus populaires pour l'étude des mécanismes de déficiences ou les perturbations cognitives (Chen *et al.*., 2010; Yi *et al.*, 2013). Les réponses physiologiques principales du stress chronique incluent l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HPA) et le système sympathico-médullosurrénale, par lesquels les niveaux de corticostérone et des catécholamines pourraient être modifiés (Cohen and Hamrick, 2003 ; Yi *et al.*., 2013). Ce qui en résulte une modification des fonctions cognitives incluant l'apprentissage et la mémoire spatiale (Yi *et al.*., 2013). Les troubles : apprentissage/mémoire spatiale sont à mettre en lien avec les altérations spécifiques de l'hippocampe dont dépendent largement ces tâches comportementales (Vann and Albasser, 2011).

Dans des situations stressantes l'hypothalamus reçoit des stimulations directes du système limbique ainsi que des stimulations noradrénergiques provenant du locus coeruleus et du noyau du tractus solitaire (Carrasco and Van De Kar, 2003 ; Itoi, 2008). En réponse à ces stimulations, l'hypothalamus libère le CRH qui active l'adenohypophyse sécrétant à son tour l'ACTH. Ce dernier induit alors la synthèse des glucocorticoïdes à partir du cholestérol par les glandes surrénales. Ces hormones sont impliquées au cours du stress dans de nombreuses régulations fonctionnelles, dans les métabolismes et le système nerveux central (Morilak, 2005).

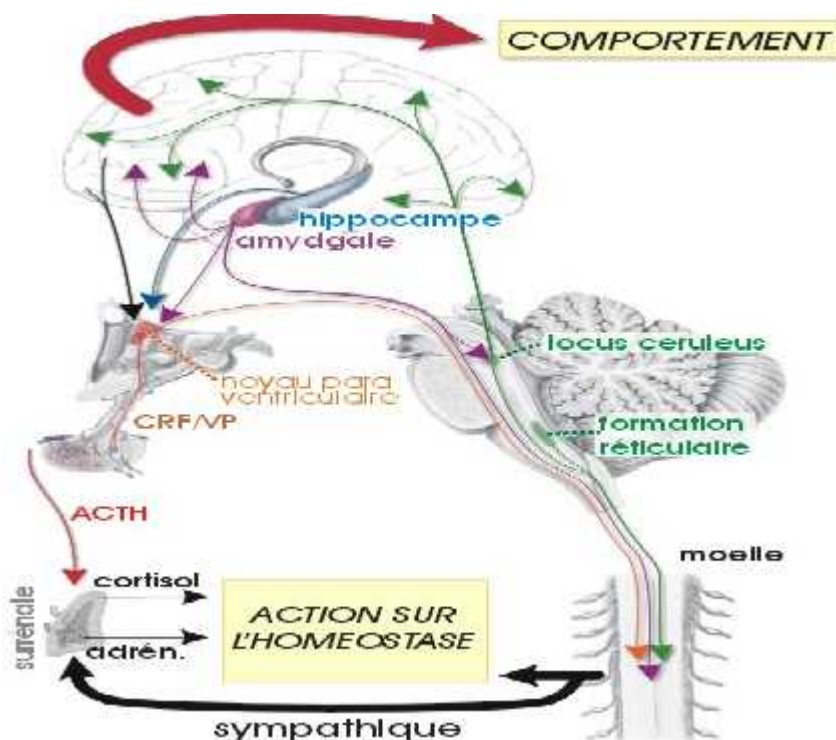


Figure 32. Trajet de la réponse au stress avec une légère modification (Jacquot, 1989).



L'hyper activation de l'axe corticotrope s'accompagne d'une hypersécrétion de cortisol donc une hyper utilisation de cholestérol comme substance mère de synthèse des glucocorticoïdes ce qui conduit à un épuisement de son taux plasmatique par sa redirection pour la synthèse des hormones dérivées ou par l'utilisation de l'acétyl coenzyme A à la synthèse d'autres substrats que le cholestérol. (Stocco and Clark, 1996 ; Galman *et al.* , 2002 ; Spandrio *et al.* , 1993). La relation entre la diminution du cholestérol et le développement de la dépression a été évoquée par Sheikh *et al* en 2004. Un autre mécanisme peut être impliqué dans l'augmentation des triglycérides, de la diminution du cholestérol et provoque la dépression et les tendances suicidaires. Il s'agit de l'augmentation de l'interleukine 2 (lymphocytes T auxiliaires ou "helper") qui permet d'amplifier la croissance et la différenciation des lymphocytes T. Cette réaction augmente la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) par les monocytes et les macrophages (Forme différenciée des monocytes) à partir de l'arginine (acide aminé) dans les cellules endothéliales. La diminution de ce dernier induit la résistance à l'insuline parce qu'il entre dans la synthèse de plusieurs hormones telles que l'hormone de croissance et insulin-like growth factor-1. L'oxyde nitrique joue un rôle important dans la dilatation des vaisseaux et prévient de l'athérosclérose provoquée par l'hypercholestérolémie. Mais lorsque le NO dépasse les concentrations physiologiques il devient toxique sur le corps par son action immunosuppressive sur les lymphocytes (stress oxydatif). Aussi le facteur de nécrose tumorale TNF qui est libéré par les granules des cellules Natural killer NK activée provoque la fragmentation de l'ADN (mort cellulaire par apoptose) peut aussi être selon des études la cause de la résistance à l'insuline en se fixant sur les récepteurs noradrénergiques ce qui augmente l'utilisation du cholestérol comme substance mère pour la synthèse des glucocorticoïdes provoquant ainsi une baisse du taux de cholestérol (Coussons-Read *et al.* , 1994 ; Penttinen, 1995).

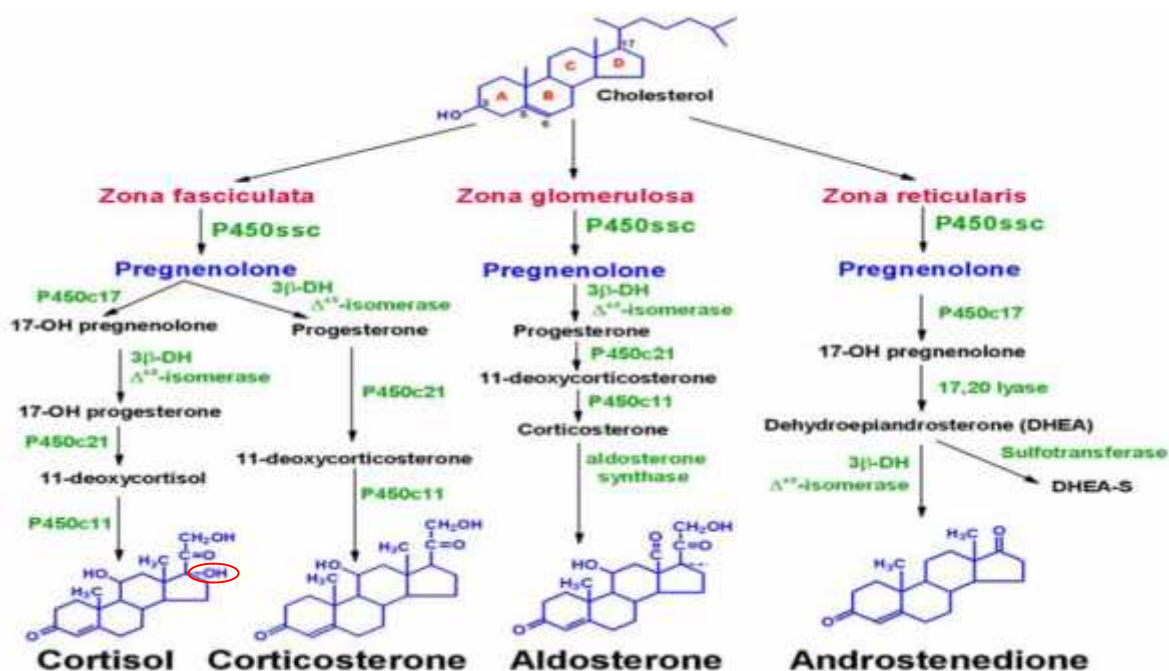


Figure 33. Synthèse des hormones dérivant du cholestérol. P450c11 correspond à l'enzyme 11 β -hydroxylase. Le rat est dépourvu d'aldostérone synthase (Smith and Vale, 2006).

Une relation entre le cholestérol, les triglycérides et les agressions dans la population humaine a été prouvée par Fowkes *et al* en 1992. L'augmentation des triglycérides est un indicateur d'un syndrome métabolique (Sarwar *et al* ., 2007). Les triglycérides présentent donc une forte relation avec la dépression (Cornel *et al* ., 2011).

Le profil biochimique de la dépression est souvent caractérisé par des taux sanguins bas de cholestérol et une élévation des triglycérides. L'hypertriglycéridémie est considérée comme cause métabolique de la dépression, il a aussi été démontré dans des essais cliniques contrôlés qu'une diminution des triglycérides améliorerait les symptômes de la dépression. Le lien entre l'hypertriglycéridémie et la dépression impliquerait la résistance à l'insuline (Mössner *et al* ., 2007). A partir de ces résultats nous pouvons rajouter un autre indice de ces modifications qu'est le poids du cerveau et des surrénales dans lesquelles nous avons trouvé une diminution significative du poids du cerveau avec augmentation significative du poids des surrénales. Au niveau de l'axe thyroïdienne, nous avons trouvé une augmentation significative du poids de la thyroïde ce qui est peut être expliqué par la synthèse excessive des hormones thyroïdiennes qui exercent un effet hypocholestérolémiant en augmentant la lipogenèse et l'oxydation des acides gras libres. Les hormones thyroïdiennes sont hyperglycémiantes (elles majorent l'absorption intestinale des glucides et favorisent la production étiatique du glucose). De nombreuses études ont démontré que la réduction de la concentration plasmatique du



cholestérol est associée à des symptômes dépressifs, suicide et mort violente (Engelberg, 1992 ; Brown *et al.* , 1994 ; Balon, 2000 ; Huang *et al.* , 2003 ; Vevera *et al.* , 2003).

Le cholestérol est le principal constituant membranaire qui présente un effet sur la croissance cellulaire et sur la fonction des protéines membranaires. Le fonctionnement d'un récepteur ou d'un transporteur pourrait être modulé directement par les interactions moléculaires spécifiques (Scanlon *et al.* , 2001), ou indirectement affecté par le cholestérol qui induit des changements de micro viscosité dans la membrane et la perméabilité (Terao *et al.* , 2000). Il a été rapporté que les taux du cholestérol sont utilisés comme des marqueurs sanguins dans la dépression et dans l'anxiété (Rafter, 2001).

Le métabolisme du glucose est un facteur résultant de l'activation des systèmes de l'organisme après une situation stressante (Hargreaves, 1990). De nombreuses études ont montré une augmentation de la concentration du glucose aussi bien après la contention que la nage forcée chez les rats (Rafter, 2001). La corticostérone est un véritable initiateur et régulateur métabolique. Cette hormone stimule l'augmentation du glucose sanguin et qui permet donc de libérer de l'énergie à partir des réserves de l'organisme. Les glucides représentent la principale source d'énergie nécessaire au métabolisme et au bon fonctionnement du cerveau et du système nerveux. Les glucocorticoïdes ont une action hyperglycémiant par stimulation de la néoglucogenèse et par une diminution de la consommation du glucose par les tissus périphériques. Au contraire la surrénalectomie provoque une tendance à l'hypoglycémie et une grande sensibilité à l'effet de l'insuline. En situation de surrénalectomie, l'organisme se trouve dans l'incapacité de mobiliser ses réserves pour maintenir une normo-glycémie en réponse à un stress (Tempel and Leibowitz, 1994). Les actions métaboliques relayées par les récepteurs aux glucocorticoïdes entraînent une augmentation de la glycémie afin de fournir aux organes vitaux une source d'énergie rapidement utilisable (Lofberg *et al.* , 2002). Par contre, le transport intra-hépatique est accru permettant la néoglucogenèse.



Facteurs génétiques et de l'environnement

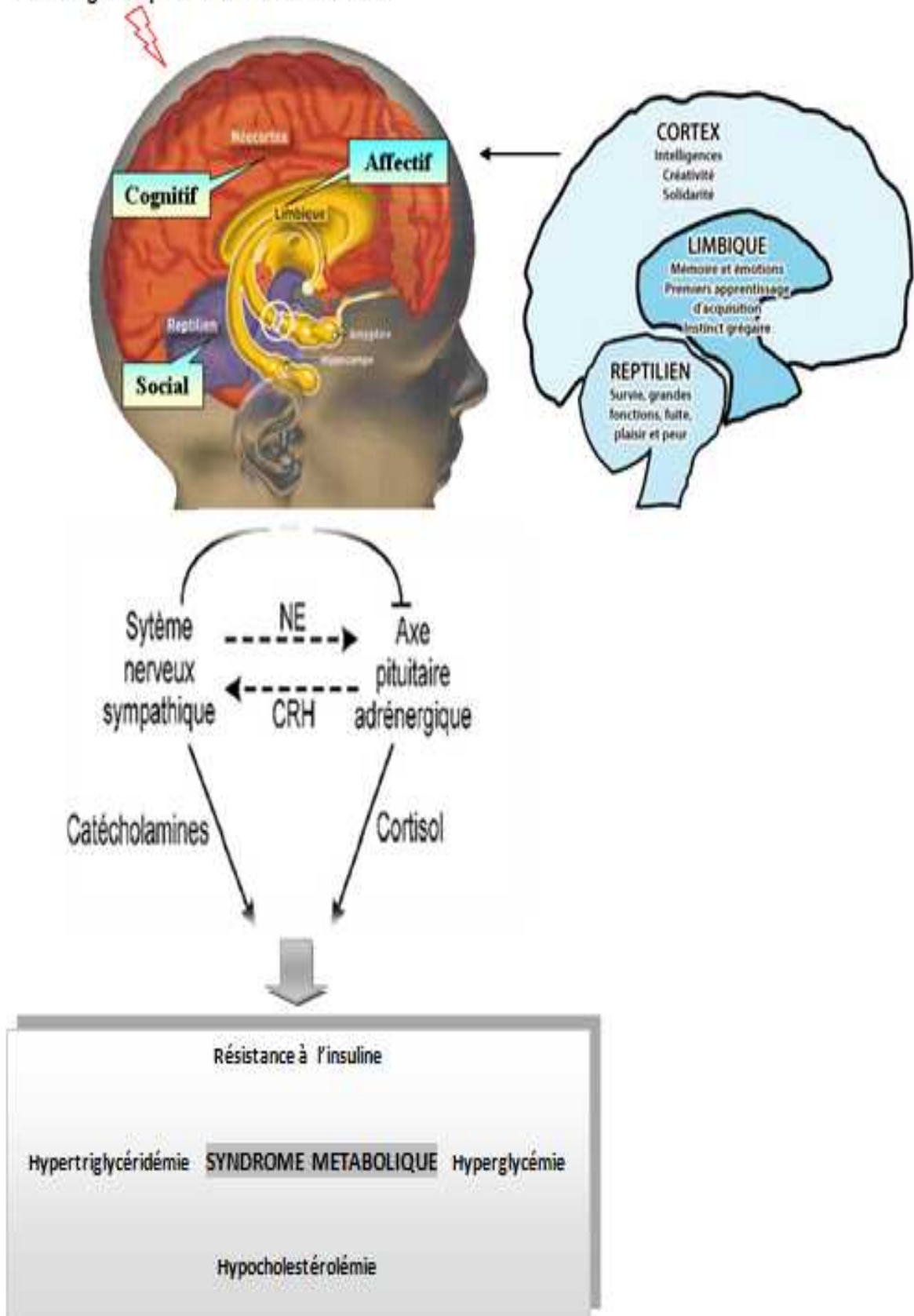


Figure 34. Rôle du stress dans le développement du syndrome métabolique.



Les glucocorticoïdes exercent différentes actions périphériques impliquées dans le métabolisme lipidique en augmentant ou stimulant la lipolyse. Une surrénalectomie entraîne une diminution de la masse grasse chez le rat et l'administration de corticostérone à faible dose rétablit les réserves lipidiques (Tempel and Leibowitz, 1994). Les régimes riches en lipides agissent comme un stress chronique en induisant une augmentation de la concentration plasmatique basale des glucocorticoïdes (Tannenbaum *et al.* , 1997).

Nous avons aussi trouvé que le CRS induit une augmentation de la concentration de progestérone plasmatique qui pourrait être médiée lentement par les glandes surrénales. Ce même résultat a été évoqué par Romeo *et al* en 2004. Rajoutant à cette augmentation, la réduction dans le poids des ovaires (mais sans signification) des rattes stressées comparées aux témoins. Celle-ci indique la diminution de l'activité du stroma, du follicule et du corps lutéal dans les ovaires. Cette diminution est due à la déficience ou l'absence des hormones gonadotrophiques, stéroïdiennes ou bien les deux qui sont dues au stress oxydatif (Saraswathi *et al.* , 2010). Ce résultat confirme l'interaction entre les hormones stéroïdiennes des ovaires et surrénaliennes et la libération de la CRH (Mahesh and Brann, 1992) pour libérer l'ACTH, la corticostérone (Buckingham *et al.* , 1978) et la progestérone surrénalienne (Shaikh and Shaikh, 1975). Aussi Guillermo *et al* en 2011 a démontré après l'application du stress de contention une élévation de la concentration plasmatique de la progestérone. La CRH est le principal régulateur de l'axe HPA qui contrôle l'utilisation de la proopiomelanocortine (peptide précurseur) par la diminution de la synthèse de la GnRH en le redirigeant pour la synthèse de l'ACTH nécessaire pour maintenir l'homéostasie dans les situations stressantes (Tilbrook *et al.* , 2000). Ce qui en résulte une diminution de la libération pulsatile de la LH. Ce processus est indépendant du niveau de cortisol induit par le stress (Wagenmaker *et al.* , 2009). Cependant, la sécrétion prolongée du cortisol contribue à la suppression de la fréquence pulsatile de la GnRH, mais seulement en présence des stéroïdes ovariennes (Oakley *et al.* , 2009) et peut affecter négativement la fonction reproductrice par l'intermédiaire de son action sur la GnRH l'hypothalamique aussi bien qu'altérer la libération de la LH (Dobson and Smith, 1995).

Les études sur les brebis ovariectomisés ont indiqué que le stress émotionnel ou l'augmentation du cortisol plasmatique sous l'effet du même type de stress (Stackpole *et al.* , 2006) provoque la diminution de la LH par deux mécanismes. Le premier mécanisme comporte l'action du cortisol par l'intermédiaire des récepteurs aux glucocorticoïdes de type II pour empêcher la réponse pituitaire à GnRH, et le deuxième par modification de la sécrétion hypothalamique de GnRH (changements de la fréquence et de l'amplitude de GnRH). Cette



réduction contribue indirectement à l'élévation de la concentration plasmatique de la progestérone. Aussi des études réalisées sur des vaches en appliquant un stress chronique thermique qui a contribué à l'augmentation de la progestérone (Abilay *et al.* , 1975 ; Roussel *et al.* , 1977).

L'augmentation de la progestérone a été associée à la dépression de la libération de la gonadotrophine (Breier and Buchanan, 1992 ; Breen *et al.* , 2008). D'autres investigateurs précédemment ont observé que le stress par la nage forcée peut augmenter la progestérone aussi bien que la sécrétion de corticostérone chez le rat mâle ainsi que chez la femelle. La sécrétion de la progestérone chez le mâle et la femelle pendant le stress provient de la glande surrénale, parce que la réponse est supprimée après la surrénalectomie (Deis *et al.* , 1989; Purdy *et al.* , 1991) et même chez le mâle humain. Les récepteurs à CRH ont été identifiés dans la plupart des tissus reproducteurs femelles comprenant l'ovaire, l'utérus et le trophoblaste (Chrousos, 1995). Aussi la présence des récepteurs d'œstrogènes ont été identifiés par van Lier *et al.* en 2001b au niveau des glandes surrénales de brebis. Il y a donc une évidence abondante que les gonades affectent la manière dont l'axe HPA répond au stress. Et que les hormones stéroïdiennes ont été trouvées capables d'augmenter l'activité de l'axe HPA sous l'effet du stress émotionnel, et d'inhiber l'activité de l'axe HPG à un certain niveau (chez les humains et les singes rhésus) (Roy *et al.* , 1999).

Il y a une évidence que le stress émotionnel peut affecter beaucoup de circuits intégrateurs entre le système immunitaire, nerveux et endocrinien chez les animaux et les humains (Dantzer and Mormede, 1995 ; Frih, 2007). Les effets complexes du stress émotionnel sur les interactions entre les trois systèmes ont été largement étudiés après l'apparition du champ de la psychoneuroendocrinoimmunologie. Dans la présente étude, nous avons exploré le système immunitaire en faisant sortir quelques paramètres qui pourraient être altérés et affectés par le stress : la formule de numération sanguine et les immunoglobulines (IgG). Ces derniers sont les premiers qui seraient libérés dans la circulation sanguine et sont les molécules les plus abondantes des immunoglobulines sériques. Ce sont les seules qui sont capables de passer de la mère à l'enfant au cours de la grossesse à travers le placenta. Ces molécules ont démontrées des effets neuroprotecteurs dans plusieurs études (Arumugam *et al.* , 2007 ; Hulse *et al.* , 2008; Zhang *et al.* , 2012b). L'immunoglobuline humaine (IgG) est le principal composant de la protection contre les lésions des neurones dopaminergiques du 6-hydroxydopamine (6-OHDA) (Zhang *et al.* , 2012b). L'IgG a traditionnellement été pensée être produite par les lymphocytes B matures, mais récemment, a été démontré qu'elle est produite par les cellules neuronales. Huang *et al.*



en 2008 ont démontré que les IgG peuvent être produites par les neurones centraux des rats (Huang *et al.*., 2008), et précédemment a été démontré que les IgG sont produites abondamment par les neurones du cortex cérébral, l'hippocampe, le gyrus dentelé, le cervelet, la protubérance, le bulbe rachidien et la moelle épinière, elle est même synthétisée par les cellules intraoculaires de l'œil chez l'homme (Niu *et al.*., 2011a). Bien que la fonction des neurones à IgG soit mal comprise, il a été suggéré que les neurones à IgG sont impliqués dans le maintien de la stabilité du système nerveux. Ces molécules deviennent toxiques sur les neurones dopaminergiques si elles sont libérées en grandes quantités. Le stress oxydatif cause des modifications dans la concentration de l'IgG sous l'influence des concentrations physiologiques de glucose (Newkirk *et al.*., 2003).

Plusieurs études ont montré que le stress émotionnel pourrait affecter la réponse immunitaire chez les animaux et les humains (Nascimento *et al.*., 2004 ; Leandro *et al.*., 2006 ; Ribas *et al.*., 2011). La diminution des globules blancs pourrait être causée par leur redistribution dans les tissus périphériques comme la peau et les ganglions lymphatique où par la destruction des cellules souches et de l'immunosuppression exercée par les glucocorticoïdes et même par les catécholamines (activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice), en inhibant la prolifération des lymphocytes T, diminuent l'activité bactéricide des macrophages et suppriment l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (NK). Cependant, les glucocorticoïdes peuvent aussi exercer des propriétés immunostimulantes sur les lymphocytes B jouer un rôle tantôt Immunostimulant, tantôt immunosuppresseur (Steele, 2002). Les leucocytes possèdent des récepteurs pour l'adrénaline, les stéroïdes sexuels, l'insuline, la prolactine, l'hormone de croissance et la thyroxine. Les monocytes provenant de la moelle osseuse n'ont pas seulement une activité phagocytaire mais aussi secrètent des enzymes, des protéines, des prostaglandines, des cytokines et même les ROS (reactive oxygen species) et le NO (reactive nitrogen species) (Pereira *et al.*., 1996) qui sont importants dans la défense contre les microbes pathogènes et les cellules tumorales. (Hibbs *et al.*., 1988 ; Macmicking *et al.*., 1997). Les niveaux élevés de cortisol stimulent l'apoptose des thymocytes et peuvent causer la lymphocytopenie et le monocytopenie (Nascimento *et al.*., 2004).

Le système immunitaire intègre également des informations nerveuses. Les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et secondaires (rate, ganglions, plaques de Peyer) sont innervés par des terminaisons nerveuses sympathiques et cholinergiques. Les leucocytes possèdent des récepteurs pour la plupart des neurotransmetteurs libérés par ces terminaisons nerveuses : catécholamines, endorphines, enképhalines, substance P,



somatostatine et vasopectide intestinal, ce qui explique l'atteinte du système immunitaire et sa relation avec le système nerveux et endocrinien (Besedovsky and Del Rey, 1996).

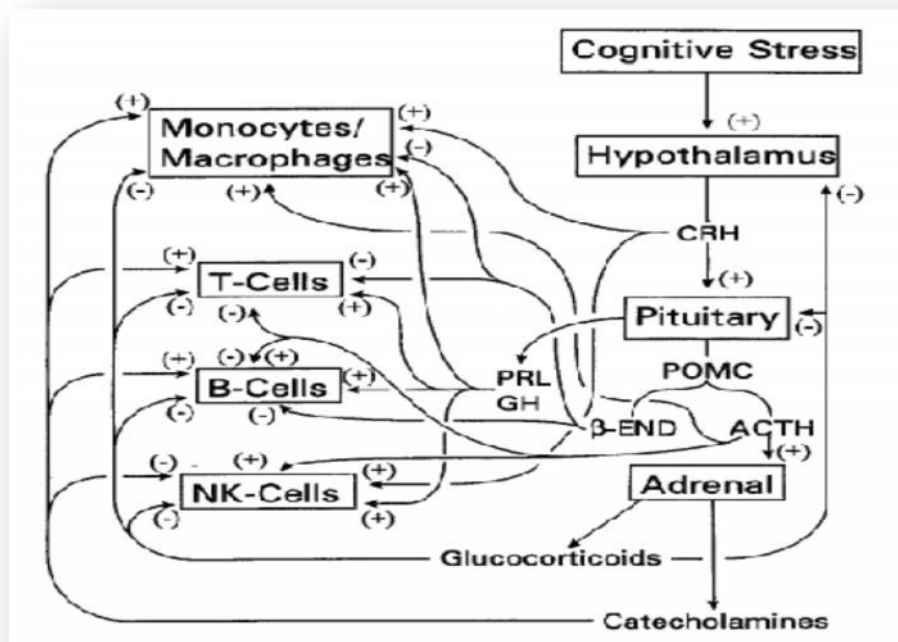


Figure 35. Mécanisme d'activation du système immunitaire par un stress cognitif.
(Blalok, 1984).

Plusieurs études tant chez l'animal que chez l'humain ont montré que le système immunitaire est impliqué dans l'apparition et le développement des troubles neurocomportementaux tel que la dépression et l'anxiété (Irwin, 1999). Des expériences réalisées sur des souris immunodéficientes présentaient des désordres cognitifs au niveau du test aquatique de Morris. Ces effets ont été réparés après injection des lymphocytes T (Kipnis *et al.*, 2008).

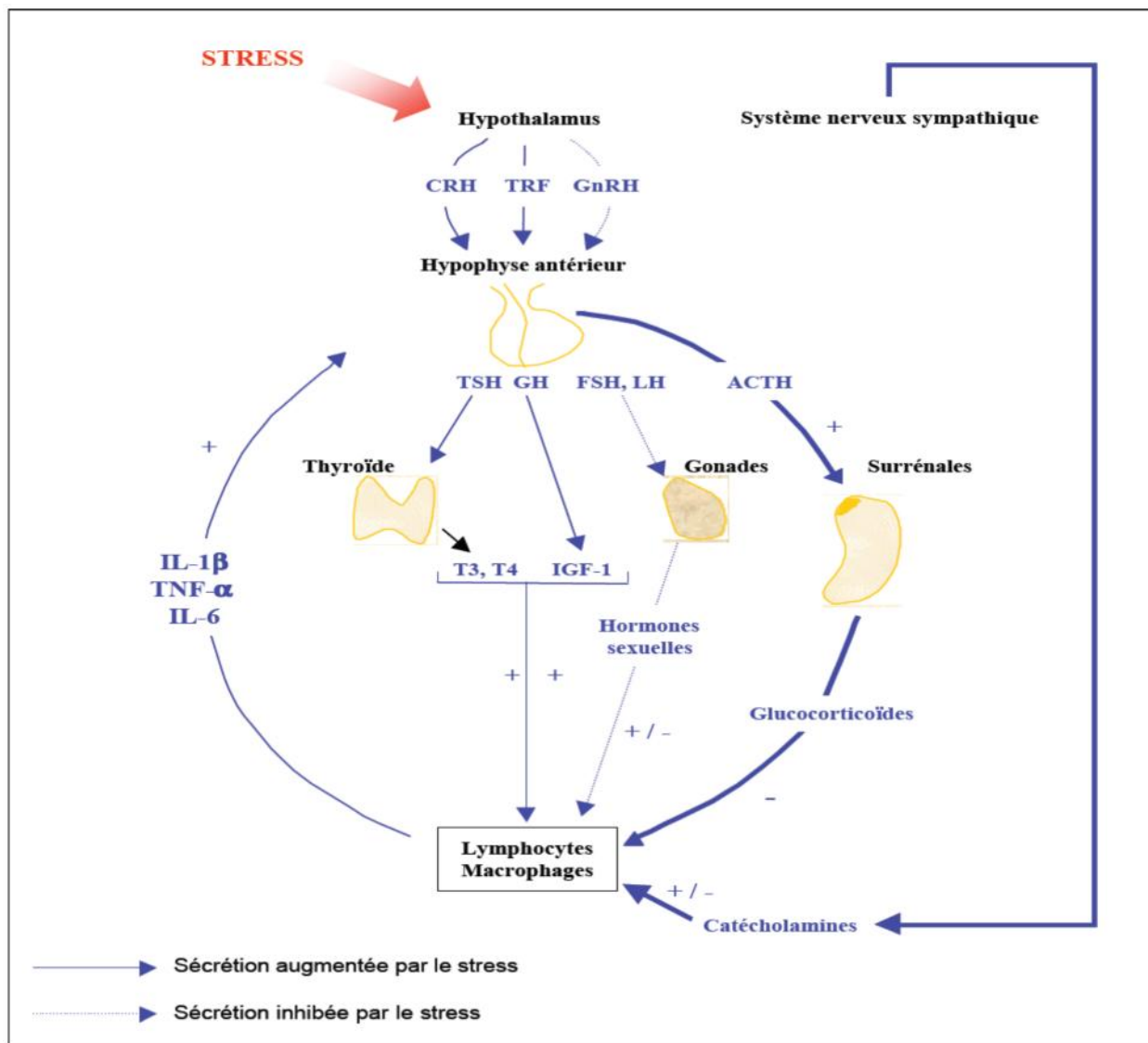


Figure 36. Collaboration entre les trois systèmes lors d'un stress émotionnel (Merlot, 2003).

Nos résultats ont montré aussi que le stress émotionnel appliqué avec une période de repos provoque des perturbations au niveau des paramètres de la ventilation pulmonaire. Aussi la diminution considérable des globules rouges, de l'hématocrite et de l'hémoglobine pourrait être expliquée par l'hyperventilation pulmonaire en réponse à l'exposition au stress avec une incapacité de combattre ou de s'enfuir (fight-or-flight) provoquée par le milieu restreint. L'absence de cette dernière conduit à une activité musculaire minime, et par conséquent un faible besoin en oxygène, ce qui aboutit à la production des érythrocytes microcytiques et hyperchromiques. L'hémoglobine participe au processus nutritif en transportant de l'oxygène nécessaire au phénomène d'oxydoréduction des nutriments (Barbosa *et al.* , 2009).



La descendance

Chez les rongeurs et les humains, le stress prénatal peut avoir des conséquences morphologiques, physiologiques et comportementales persistantes (Dudley *et al.* , 2011; Harris and Seckl, 2011 ; Yong *et al.* , 2012 ; Trickey *et al.* , 2012 ; Neigh *et al.* , 2013). Nos travaux montrent que le stress chronique de contention provoque une augmentation du poids corporel de la descendance qui est en accord avec des études réalisées sur des mères diabétiques et semi diabétiques (Inhasz Kiss *et al.* , 2012). Ceci pourrait être en relation avec des altérations ou des changements de la concentration plasmatique de la corticostérone qui pourrait affecter la composition du corps et être le facteur causal de l'apparition précoce de l'obésité, le syndrome métabolique, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2 (Pervanidou and Chrousos, 2011 ; Dudley *et al.* , 2011 ; Paternain *et al.* , 2012). Les mêmes résultats ont été démontrés chez des mères déprimées pendant la gestation (Taveras *et al.* , 2010 ; Watt *et al.* , 2013).

Chez les humains, les concentrations placentales de la CRH pendant la grossesse prédisent la proportion de la croissance et de la taille fœtale qui sont des prédicteurs importants de l'enfance et de l'adiposité (Darnaudéry and Maccari, 2008). L'exposition aux glucocorticoïdes maternels provoque des modifications structurales dans le pancréas en diminuant les cellules pancréatiques β ce qui affecte la glycémie et les hormones de la croissance. Ces glucocorticoïdes induisent des modifications fonctionnelles dans le tissu hépatique (Welberg *et al.* , 2001) en modifiant le métabolisme. D'un autre côté, d'autres études ont démontré que le stress peut réduire le poids corporel (Mairesse *et al.* , 2007a ; Grimm and Frieder, 1987). Le même résultat a été démontré par Barlow en 1978 après l'application du stress de contention pendant 3 jours dans n'importe quelle phase de la gestation. Un stress appliqué à la fin de la gestation réduit temporairement le poids corporel de la descendance, tandis qu'un stress appliqué au début de la grossesse a abouti à l'augmentation à long terme du poids corporel de la descendance (Mueller et Bale, 2006 ; Brummelte *et al.* , 2012). Ceci contribue à renforcer également nos résultats concernant le stress avant gestation qui a provoqué une augmentation du poids corporel de la descendance mâles et femelles.

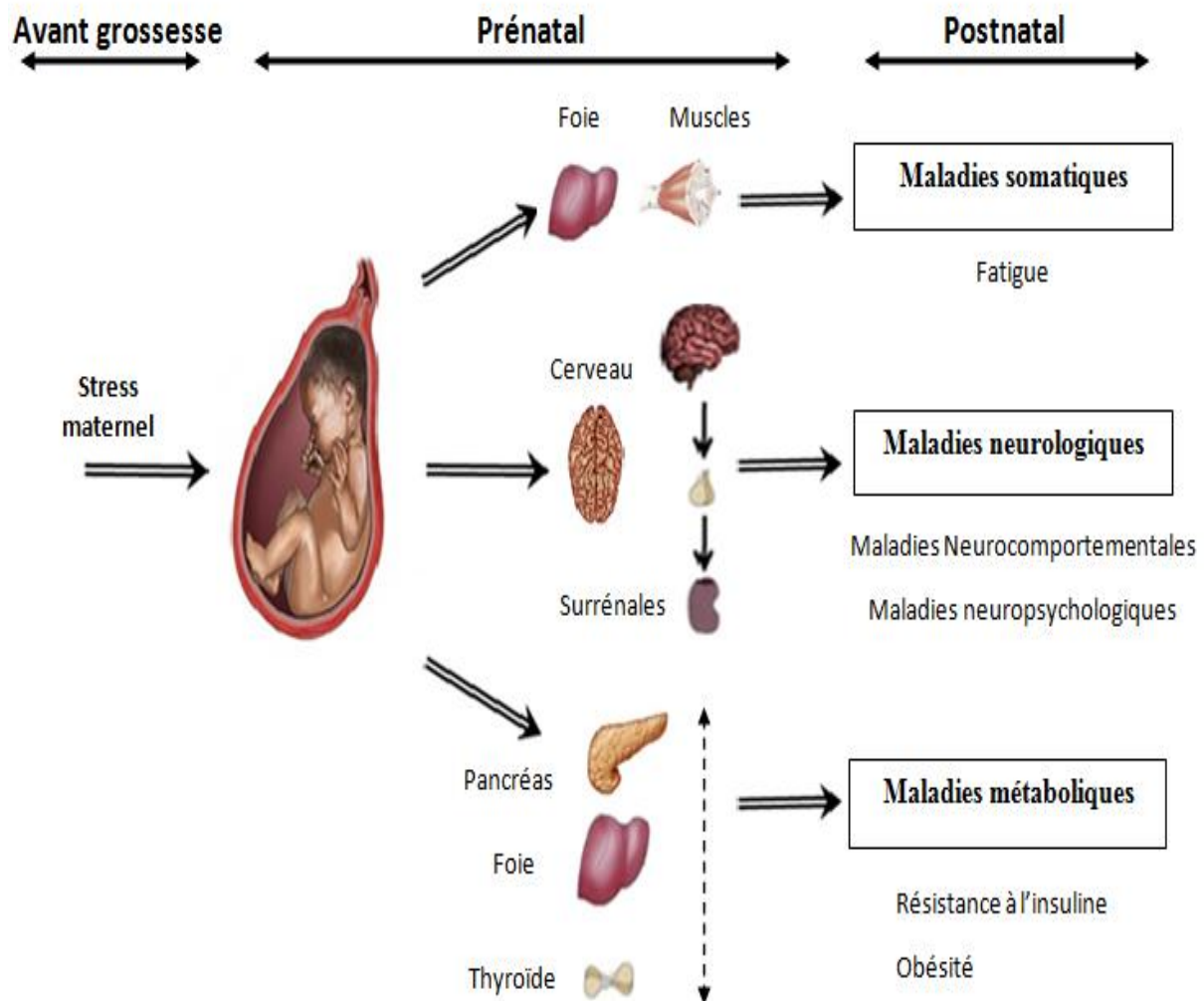


Figure 37. Effets de la programmation de l'axe HPA avant la grossesse.

L'élévation des glucocorticoïdes maternels (GCs) suite à l'activation de l'axe HPA peuvent traverser la barrière placentaire et atteindre le fœtus en affectant par la suite le développement de son cerveau (Welberg *et al.*., 2000 ; Brummelte *et al.*., 2012 ; Baibazarova *et al.*., 2013). Les glucocorticoïdes subissent une dégradation partielle par l'enzyme 11 B-hydroxy stéroïde déshydrogénase en produits inactifs (Welberg *et al.*., 2001 ; Fujisawa *et al.*., 2007). Cette enzyme joue un rôle clé réglant les concentrations intracellulaires des glucocorticoïdes et l'obésité associée à l'activité croissante de l'enzyme dans le tissu adipeux des humains (Rask *et al.*., 2001 ; 2002) et des animaux (Livingstone *et al.*., 2000 a, b).



Cependant, l'exposition prénatale au stress chronique mène à une diminution de l'activité de l'enzyme 11β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11β -HSD1) par l'augmentation de la corticostérone maternelle atteignant le fœtus (Mairesse *et al.*, 2007 ; Baibazarova *et al.*, 2013). Cette diminution de la 11β -HSD1 hépatique a été proposée comme un mécanisme compensatoire pour protéger le foie de l'excès des glucocorticoïdes (Livingstone *et al.*, 2000a, b). Le début de l'obésité et de la résistance à l'insuline sont parfois associés aux déséquilibres hormonaux. En outre, la grosse distribution des dépôts au niveau viscéral et sous-cutané est réglée par la sécrétion de différentes hormones comprenant le cortisol, l'insuline, l'œstrogène, la dihydrotestostérone et les hormones de croissance (Mattsson and Olsson, 2007).

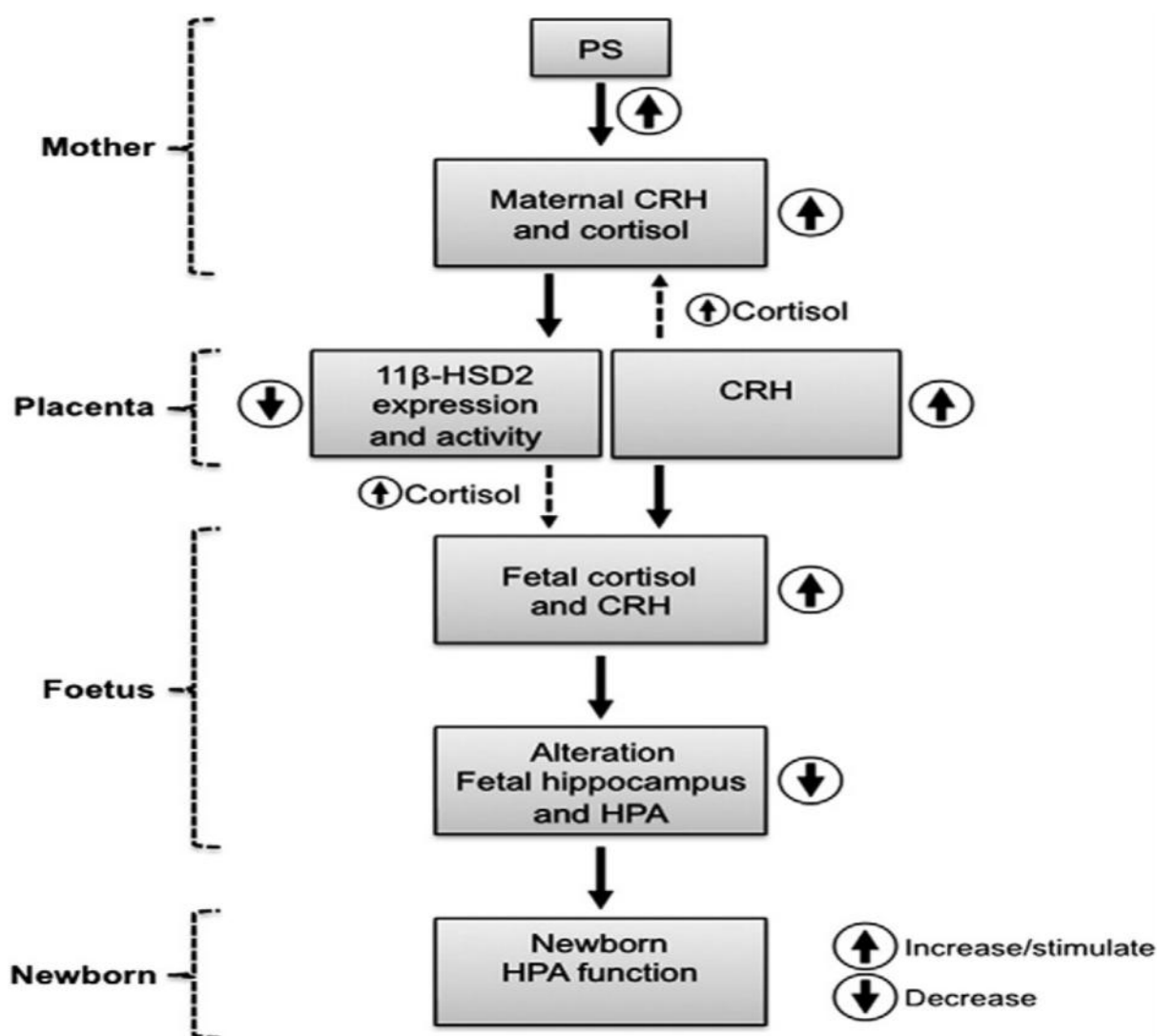


Figure 38. Rôle du stress sur le développement placentaire du fœtus (Charil *et al.*, 2010).



Les résultats de notre étude montrent aussi que le stress chronique de contention était responsable de l'apparition des désordres neurocomportementaux chez la descendance résultante des mères stressées avant la gestation après leur évaluation dans les tests comportementaux avant et après sevrage. Ces désordres sont les résultats de dysfonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien HPA des mères donc l'augmentation de la concentration plasmatique en glucocorticoïdes et de la glycémie, visant à confronter la situation stressante (Seyle, 1936 ; Gadek-Michalska and Bugajski, 2003 ; Kulkarni and Juvekar, 2008 ; Neigh *et al.* , 2013). L'hyper activation de l'axe HPA des mères active l'axe HPA de la descendance qui affecte la relation mère-enfant en influençant ainsi le développement du cerveau embryonnaire et modifiant le comportement de la descendance de manière permanente (Gheorghe *et al.* , 2010 ; Mychasiuk *et al.* , 2011 ; Baibazarova *et al.* , 2013).

Le développement comportemental de la descendance est probablement obtenu par des anomalies fonctionnelles et/ou anatomiques du système nerveux central (SNC) puisque nous savons que le stress change le développement du SNC avec de fortes modifications épigénétiques (Gheorghe *et al.* , 2010 ; Dudley *et al.* , 2011). Le stress aigu ou chronique peut affecter les fonctions cérébrales comme le contrôle de la coordination, de la posture et au bon ajustement et du processus cognitif (Bonatto *et al.* , 2006 ; Torres *et al.* , 2007) : test de retournement, test antigravitaire, ouverture des yeux et activité locomotrice spontanée. Il est à noter que ces résultats ont été observés chez des ratons issus des mères stressées pendant gestation (Patin *et al.* , 2004 ; Leslie *et al.* , 2000). Ceux-ci sont en accord avec nos résultats quand les rats adultes nés des mères stressées avant gestation présentent des changements cognitifs et émotionnels. Nos résultats montrent que l'augmentation de la distance traversée (locomotion) dans le test du champ ouvert après sevrage est expliquée par l'hyperactivité de la descendance. Qui est associée à une hyperactivité permanente de l'axe HPA due à une perturbation de la sérotonine et de la dopamine au niveau du système nerveux central (Katz *et al.* , 1981 ; Tobach, 1966 ; Baibazarova *et al.* , 2013) et de l'apparition de la dépression à l'âge adulte qui est associée à l'hyperactivité de l'axe HPA de leurs mères stressées (Trickey *et al.* , 2012 ; Brummelte *et al.* , 2012).

Bien que d'autres études signalaient que le stress prénatal provoquait une réduction de la locomotion (Emack *et al.* , 2008 ; Patin *et al.* , 2004) et l'apparition de la dépression à l'âge adulte qui est due à la modification dans la neurochimie cérébrale suite à l'exposition au stress chronique. Ce qui a été également démontré que beaucoup de modifications entre autres



l'augmentation de certains neurotransmetteurs en particulier l'acide Gamma-Amino-Butyrique GABA dans l'hypothalamus (Bowers *et al.*., 1998 ; Gowan *et al.*., 2009 ; Heim and Binder, 2012) qui provoque des désordres dépressifs qui ont été également associés aux mécanismes épigénétiques. Il est à noter que ces recherches ont été réalisées soit pendant soit après gestation.

Le dysfonctionnement de la biochimie neuronale a été aussi démontré dans le test aquatique de Morris dans lequel nous avons également constaté des modifications dans les capacités mémoratives de la descendance. Celles-ci ont été démontrées par le nombre d'entrée dans le quadrant cible et le temps passé dans le même quadrant (Leslie *et al.*., 2000 ; Takuma *et al.*., 2012). Toutes ces variations sont expliquées par les effets des glucocorticoïdes qui peuvent agir au niveau central sur l'hippocampe, amygdale, le cortex préfrontal et l'hypothalamus qui sont les centres de l'intégration d'information émotionnelle et physique et qui sont riche en récepteurs glucocorticoïdes (GsR) et minéralcorticoïdes (MsR). Ceux-ci qui augmentent en réponse au stress chez la mère et qui a comme conséquence l'augmentation des risques de l'exposition du fœtus aux glucocorticoïdes. Ceci amène à un rétrocontrôle des GR dans l'hippocampe et à l'atténuation de la rétroaction négative de l'axe HPA avec modification de son activité. Ce qui en résulte par la suite des changements au niveau comportemental, cognitif, apprentissage, mémoire (De Kloet, 2000 ; De Kloet *et al.* 2005 ; Herman *et al.*., 2005 ; Fietta *et al.*., 2009 ; Harris and Seckl, 2011 ; Brummelte *et al.*., 2012). L'activation prolongée de l'axe HPA mène aux modifications fonctionnelles structurales au niveau du système nerveux central (Magarinos & Ewen, 1995 ; Radley *et al.*., 2008 ; Mychasiuk *et al.*., 2011).

Plusieurs chercheurs ont étudié les effets du stress prénatal sur le développement précoce. Ils ont mentionné que le stress peut retarder le développement de certains paramètres neurocomportementaux et neurophysiologiques en provoquant des désordres neuropsychiatriques dans la vie postérieure (Grimm and Frieder, 1987 ; Dudley *et al.*., 2011 ; Archer, 2011 ; Chen and Zhang, 2011 ; Harris and Seckl, 2011). Les mêmes résultats ont été trouvés après application du stress chronique de contention sur des rats pendant 3 jours dans n'importe quelle phase de la grossesse (Barlow *et al.*., 1978). Deux autres types de stress : le bruit et le stress par la lumière appliqués trois fois par semaine pendant la gestation retardent la capacité des rattons issus des mères stressées. La descendance de celles-ci ont montré une réponse négative au niveau des tests : retournement, antigravitaire, nage forcée et d'autres tests de maturation neurocomportementale (Baibazarova *et al.*., 2013).



5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats de notre étude sur le stress chronique de contention appliqué sur des rattes wistar avant gestation 1h/jour/4jours/semaine/5semaines affecte la physiologie de l'organisme et soulignent l'importance des adaptations biochimiques, hormonaux et comportementaux. Ainsi, il semble donc que les glucocorticoïdes agissent directement sur l'homéostasie énergétique et hormonale. Nos résultats confirment la relation entre les paramètres biochimiques (triglycérides, le cholestérol, la glycémie), la diminution du poids corporel et le développement du comportement anxieux et dépressif chez les mères.

Le stress chronique de contention affecte aussi l'axe gonadotrope. Cette modification a été rencontrée par l'augmentation de la progestérone et la perturbation des paramètres de la reproduction. Les résultats de cette expérimentation mettent en valeur des voies de transmission à travers des nouvelles générations des dommages cognitifs et comportementaux.

Les signaux environnementaux peuvent être transmis de la mère au fœtus en affectant des tissus spécifiques qui deviennent vulnérables à leur sensible étape développementale tout en modulant la trajectoire du développement normal qui transforment leur structure et leur fonction avec reprogrammation de l'élasticité ou de la susceptibilité aux maladies dans la vie postnatale.

L'environnement intra-utérin est critique au développement fœtal. La perturbation de cet environnement peut avoir des conséquences significatives à court ou au long terme sur le développement de la progéniture (neurocomportementale, psychologique et développementale). Nous sommes attachés à étudier les effets du stress chronique de contention appliqué avant gestation sur le développement de la descendance qui s'avère être la cause des modifications dans l'activité comportementale, émotionnelle, cognitive, et neurologique de la descendance.



A partir de ces résultats, il serait souhaitable de réaliser les perspectives suivantes :

- Faire une exploration au niveau moléculaire et génétique surtout pour l'expression des récepteurs aux corticoïdes et aux hormones sexuelles pour voir la différence entre les mâles et les femelles.
- Dosage de l'interleukine IL2 et les cytokines pro inflammatoires : IL1, IL6, TNF α .
- Dosage des paramètres du stress oxydatif GST, GSH, Protéines, Catalase, Acétylcholine estérase, MDA, NO.
- Dosage de la Prolactine, Corticostérone.
- Dosage de la GnRH, de la CRH et de l'ACTH.
- Dosage des neurotransmetteurs : Sérotonine, Dopamine.
- Voir les effets à long terme (sur au moins deux générations) de ce type de stress, et voir si ces effets disparaissent par le temps ou développent d'autres maladies avec une étude thérapeutique en utilisant des plantes médicinales.



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abilay TA, Johnson HD, Madan M. Influence of environment heat on peripheral plasma progesterone and cortisol during the bovine estrous cycle. *J. Dairy Sci.* 1975 ; 58, 1836-1848.

Archer T. Effects of exogenous agents on brain development: stress, abuse and therapeutic compounds. *CNS Neuroscience & Therapeutics* 2011 ; 17, pp. 470–489.

Armario A, Marti J, Gil M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 1990 ; 15, 341-347.

Airman J, Sudarsham K. Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav* 1975 ; 23, 896-920.

Arumugam TV, et al. Intravenous immunoglobulin (IVIG) protects the brain against experimental stroke by preventing complement-mediated neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007 ; 104 : 14104–14109.

Bagel MD, Smilkstien G, Regen H, Montano D. Psychosocial influences on new born outcomes: a controlled prospective study. *soc sci Med* 1990 ; 30:597-604.

Baibazarova E, van de Beek C, Peggy T. Kettenis C, Buitelaar J, Katherine H. Shelton, van Goozen SHM. Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology* 2013 ; 38, 6, Pages 907–915.

Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH. *The Laboratory rat, Vol. II, Research Application.* Academic Press. New York, NY. 1980.

Balon R. Cholesterol, mental illness and violence. *Psychiatry.* 2000 ; 2, 83– 90.

Barbosa FT, Jucá MJ, Castro AA, Duarte JL, Barbosa LT. Artificial oxygen carriers as a possible alternative to red cells in clinical practice. *São Paulo Med J.* 2009 ; 127(2):97-100.



Barbosa GA. The association of life events to gestational age at delivery among low-income, urban, African-american women. *J Perinatol* 2000 ; 20, 438–42.

Bardin L, Malfetes N, Newman-Tancredi A, Depoortère R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behavioural Brain Research*. 2009 ; 205, 360–366.

Barlow SM, Knight AF, Sullivan FM. Delay in postnatal growth and development of offspring produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology* 1978 ; 18, 211 -8.

Barreto-Medeiros J, Queiros-Santos A, Cabral-Filho JE, Ferreira E Silva WT, Leandro CG, Deiró TC, Manhaes-de-Castro R, Machado Barbosa de-Castro CM.: Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation* 2007 ; 14, 229-334.

Besedovsky HO, del Rey AE, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukine-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986 ; 233 : 652-654.

Bhatnagar S, Dallman M. Neuro-anatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 1998; 84, 1025–1039.

Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J-Immunol*. 1984 ; 132 : 1067-1070.

Bonatto F, Polydoro M, Andrades ME, Conte da Frota JR, ML, Dal-Pizzol F, Rotta LN, Souza DO, Perry ML, Fonseca Moreira JC. Effects of maternal protein malnutrition on oxidative markers in the young rat cortex and cerebellum. *Neuroscience Letters* 2006 ; 406, pp. 281–284.

Boston P, Serdar M, Reveley D, Reveley M. Cholesterol and mental disorder. *Br J Psychiatry* 1996 ; 169, 682-9.



Bowers G, Cullinan WE, Herman JP. Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci* 1998 ; 18, 5938-5947.

Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun* 2008 ; 22, 105–13.

Breen KM, Davis TL, Doro LC, Nett TM, Oakley AE, Padmanabhan V, Rispoli LA, Wagenmaker EW, Karsch FJ. Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 2008 ; 149, 767-773.

Breier A., Buchanan R.W. The effects of metabolic stress on plasma progesterone in healthy volunteers and schizophrenic patients. *Life Sci.* 1992 ; 51, 1527– 1534.

Brittney M, Coxa FA, Peter C, Neilla Mc, Matthew P, Galloway b, Shane A, Perrine A. Neurochemical, hormonal, and behavioral effects of chronic unpredictable stress in the rat. *Behavioural Brain Research*. 2011 ; 220, 106–111

Brown SL, Salive ME, Harris TB, Simonsick EM, Guralnik JM, Kohout FJ. Low cholesterol concentrations and severe depressive symptoms in elderly people. *B M J* 1994 ; 308(6940), 1328-1332.

Brummelte S, Lieblich SE, Galea LA.M. Gestational and postpartum corticosterone exposure to the dam affects behavioral and endocrine outcome of the offspring in a sexually-dimorphic manner. *Neuropharmacology* 2012 ; 62, 406e418.

Buckingham JC, Dohler K, Wilson C. Activity of the pituitary–adrenocortical system and thyroid gland during oestrous cycle of the rat. *J. Endocrinol.* 1978 ; 78, 359–366.

Buynitsky T & Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev* 2009 ; 33, 1089-1098.



Calvez J. Stress et prise alimentaire Application à l'étude de l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). 2010.

Carey De Palma G, Damianopoulos E. Cocaine-conditioned behavioural effects: a role for habituation processes. *Pharmacol Biochem Behav* 2003 ; 74(3), 701–12.

Carrasco GA, Van de Kar LD. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol* 2003 ; 463, 235-272

Castro R. Hematological and immunological effects of stress of air traffic controllers in northeastern Brazil. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2011 ; 33(3), 195-201.

Charil AP, Laplante D, Vaillancourt C, King S. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews* 2010 ; 65, 56– 79.

Chen M, Zhang L. Epigenetic mechanisms in developmental programming of adult disease. *Drug Discovery*. 2011 ; pp.1007–1018.

Chrousos GP, Gold P W. the concept of stress and stress system disorders .*JAMA* 1992 ; 267,(9) 1244.

Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Eng J Med*. 1995 ; 332,1351-62.

Chen Y, Mao Y, Zhou D, Hu X, Wang J, Ma Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. *Behav Brain Res* 2010 ; 212, 49–56.

Cliona M, O'Mahony A, Gerard CB, Sinead GB, Timothy G, Dinan BC, John F. Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: Relevance to depression *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 2011 ; 97, 690–699.



Cohen S, Hamrick N. Stable individual differences in physiological response to stressors: implications of stress elicited changes in immune related health. *Brain Behav Immun* 2003 ; 17, 407–14.

Cornel VI, Juhani J, Hannu V. Vital exhaustion, depressive symptoms and serum triglyceride levels in high-risk middle-aged men. *Psychiatry Research* 2011 ; 187, 363–369.

Coussons-Read ME, Maslonek KA, Fecho K, Perez L, Lysle DT. Evidence for the involvement of macrophage-derived nitric oxide in the modulation of immune status by a conditioned aversive stimulus 1994 ; 50, 51-58.

Creasy R. Preterm labor and delivery. Philadelphia: W.B. Saunders. 1994.

Da Costa D, Larouche J, Dritsa M, Brender W. Psychosocial correlates of prepartum and postpartum depressed mood. *J Affect Disord* 2000 ; 59, 31–40.

Da-Silva VA, Malheiros LR, Figueiredo LFH, Sa-Rego MM, Paumgarten FJR. Neurobehavioral development of rats exposed to toluene through maternal milk. *Brazilian J. Med. Biol. Res* 1991 ; 23, 533-537.

Datson N A, Morsink MC, Meijer O C, De Kloet ER. Central corticosteroid actions: Search for genetargets , *Eur J Pharmacol* 2008 ; 583(2-3):272-89.

Dantzer R, Mormède P. Psychoneuroimmunology of stress. In Leonard B, Miller K. (eds.), *Stress, the Immune System and Psychiatry*. West Sussex (UK), John Wiley & Sons Ltd. 1995 ; 19-32.

Darnaudéry M, Maccari S. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain research reviews* 2008 ; 57, 571–585.



Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization : acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *The European journal of neuroscience*. 2001 ; 14:1143-52.

Deis RP, Leguizamon E, Jahn GA. Feedback regulation by progesterone of stress-induced prolactin release in rats. *J Endocrinol*. 1989 ; 120, 37–43.

De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 2005 ; 6,463–75.

De Kloet ER. Stress in the brain. *Eur J Pharmacol*. 2000 ; 405, 187-198.

Dobson H, Smith RF. Stress and reproduction in farm animals. *J Reprod Fertil Suppl*. 1995 ; 49,451– 61.

Dudley KJ, Li X, Kobor MS, Kippin TE, Bredy TW. Epigenetic mechanisms mediating vulnerability and resilience to psychiatric disorders. *Neuroscience Biobehavioral, Review* 2011 ; 35, 1544–1551.

Emack J, Kostaki A, Walker CD, Matthews SG. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamus–pituitary–adrenal function in juvenile offspring. *Horm. Behav*. 2008 ; 54, 514–520.

Engelberg H. Low serum cholesterol and suicide. *Lancet* 1992 ; 339(8795): 727-729.

Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971 ; 8(9), 871-4.

E.T.A.P. Rapport d'étude. *Ethologie Appliquée*. Ingridia. 2001 ; No18/1100/ING 911. *Toxicologie Comportementale*.



Fernandez ME, Alfonso J, Brocco MA, Frasch AC. Conserved cellular function and stress-mediated regulation among members of the proteolipid protein family. *J Neurosci Res* 2010 ; 88:1298–308.

Fietta P, Fietta P & Delsante G. Central nervous system effects of natural and synthetic glucocorticoids. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009 ; 63, 613-622.

Fowkes FG, Leng GC, Donnan PT, Deary IJ, Riemersma RA, Housley E. Serum cholesterol, triglycerides, and aggression in the general population. *Lancet* 1992 ; 340(8826), 995-998.

Freeman M P, Rapaport M H. Omega-3 fatty acids and depression: from cellular mechanisms to clinical care, *J Clin Psychiatry* 2011 ; 72(2), 258-9.

Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, et al. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009 ; 12:134–43.

Frih H. Etude des effets du stress post traumatique sur les variations neuro-immuno-endocriniennes chez l'homme. Thèse de doctorat. Faculte des sciences departement de biologie, Université Badji-Mokhtar Annaba, Algerie. 2007.

Fuhlendorff J, Rorsman P, Kofod H, Brand CL, Rolin B, MacKay P, Shymko R, Carr RD. Stimulation of insulin release by repaglinide and glibenclamide involves both common and distinct processes. *Diabetes* 1998 ; 47 (3), 345–351.

Fujisawa Y, Nakagawa Y, Li RS, Liu YJ, Ohzeki T. Diabetic pregnancy in rats leads to impaired glucose metabolism in offspring involving tissue-specific dysregulation of 11 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression. *Life Sciences* 2007 ; 81, 724–731

Gadek-Michalska A, Bugajski J. Repeated handling, restraint, or chronic crowding impair the hypothalamic-pituitary-adrenocortical response to acute restraint stress. *J. Physiol. Pharmacol.* 2003 ; 54, pp. 449–459.



Galman C, Angeli B, Rudling M. Prolonged stimulation of the adrenals by corticotropin suppresses hepatic low-density lipoprotein and high-density lipoprotein receptors and increases plasma cholesterol. *Endocrinology* 2002 ; 143, 1809-16.

Garcia-Bueno B, Caso JR, Leza JC. Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 2008 ; 32, 1136-1151.

Gheorghe CP, Goyal R, Mittal A, Longo L. Gene expression in the placenta: maternal stress and epigenetic responses. *Int. J. Dev. Biol.* 2010 ; 54, 506-523.

Graignic-Philippe R, Tordjman S, Granier-Deferre C, Ribeiro A, Jacquet AY, Cohen-Salmon C, Fortes S, Gérardin P. Le stress prénatal : état de la question et perspectives. *Neuropsychiatrie de l'enfance et de l'adolescence* 2005 ; 53, 54–61.

Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalunchuk L E. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav Brain Res* 2005 ; 156, 105-14.

Grimm VE, Frieder B. The effects of mild maternal stress during pregnancy on the behavior of rat pups. *Int. J. Neurosci.* 1987 ; 35 ,65–72.

Grozier WJ, Pincus G. The geotropic conduct of young rats. *J. Gen. Physiol* 1926 ; 10, 257-269.

Gronli J, Murison R, Fiske E, Bjorvatn B, Sorensen E, Portas CM. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions. *Physiol Behav* 2005 ; 84, 571–7.

Guillermo A, Ariza T, Celso RF. The CRH-R1 receptor mediates luteinizing hormone, prolactin, corticosterone and progesterone secretion induced by restraint stress in estrogen-primed rats. *Brain Research* 2011 ; 1421, 11–19.



Hauber Gameiro G, Hauber Gameiro P, Da Silva Andrade A, Ferrinho Pereira L, Trevisani Arthuri M, Klein Marcondes F, Ferraz De Arruda Veiga MC. Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiology & Behavior*. 2006 ; 87, 643–649.

Hall C S. Emotional behavior in the rat. Defecation and urination as measures of individual difference in emotionality. *J.Comp Physical* 1934 ; 18, 385-403.

Haenisch B, Bilkei-Gorzo A, Caron MG, Bönisch H. Knockout of the norepinephrine transporter and pharmacologically diverse antidepressants prevent behavioral and brain neurotrophin alterations in two chronic stress models of depression. *J Neurochem* 2009 ; 111, 403–16.

Hageman I, Nielsen M, Wortwein G, Diemer N H, Jorgensen M B. Electroconvulsive stimulations normalizes stress-induced changes in the glucocorticoid receptor and behaviour. *Behav Brain Res* 2009 ; 196, 71–7.

Hansen D, Lou HC, Olsen J. Serious life events and congenital malformations: a national study with complete follow-up. *Lancet* 2000 ; 356, 875–80.

Hargreaves KM. Neuroendocrine markers of stress. *Anesth Prog* 1990 ; 37, 99-105.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Hormones and Behavior* 2011 ; 59, pp. 279–289.

Handley SL, Mithani S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a mazeexploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 1984 ; 327, 1-5.

Heerklotz H, Tsamaloukas A. Gradual Change or Phase Transition: Characterizing Fluid Lipid-Cholesterol Membranes on the Basis of Thermal Volume Changes. *Biophysical Journal* 2006 ; 91, 600–607.



Heim C, Binder EB. Current research trends in early life stress and depression: Review of human studies on sensitive periods, gene-environment interactions, and epigenetics. *Exp. Neurol.* 2012 ; 233, 102–111.

Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2005 ; 29,1201- 1213.

Hibbs JB, Taintor RB, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: Acytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 ; 57(1):87-94.

Homer CJ, James SA, Siegel E. Work-related psychosocial stress and risk of preterm, low birthweight delivery. *Am J Public Health* 1990 ; 80, 173–7.

Horstmann S, Binder EB. Glucocorticoids as predictors of treatment response in depression. *Harv. Rev. Psychiatry* 2011 ; 19, 125- 143.

Huang J, Sun X, Mao Y, Zhu X, Zhang P, Zhang L, et al. Expression of immunoglobulin gene with classical V-(D)-J rearrangement in mouse brain neurons. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008 ; 40:1604–15.

Huang TL, Wu SC, Chiang YS, Chen JF. Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. *Psychiatry Research* 2003 ; 118, 147–153.

Hulse KE, Woodfolk JA. Targeting allergen to Fc gammaRI: a strategy to treat allergic disease? *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2008 ; 8:547–552.

Huynh TN, Krigbaum AM, Hanna JJ, Conrad CD. Sex differences and phase of light cycle modify chronic stress effects on anxiety and depressive-like behavior. *Behav Brain Res* 2011; 222, 212–22.

Irwin M. Immune correlates of depression. *Adv Exp Med Biol*, 1999 ; 461 : 1-24.



Inhasz Kiss AC, Woodside B, Felício L F, Anselmo-Franci J, Damasceno DC. Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiology & Behavior* 2012 ; 107, 292–300.

Itoi K. Ablation of the central noradrenergic neurons for unraveling their roles in stress and anxiety. *Ann N Y Acad Sci* 2008 ; 1129, 47-54.

Jadot G. Le rat de laboratoire. Réactifs biologie.- Tome 1.- Paris: Masson. 1981 ; p 115.

Jacquot C. In : *Pharmacologie Fondamentale*. Paris. 1989.

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. *Neuroscience and bio behavioral reviews* 1987; 5, 247-51.

Keichrio M, Hiroko T. The impact of stress on reproduction: are glucocorticoids inhibitory or protective to gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2006 ; 147(3), 1085-90.

Kipnis J, Derecki NC, Yang C, Scrable H. Immunity and cognition/what do age-related dementia,HIV-dementia and ‘chemo-brain’ have in common?. *Trends Immunol* 2008 ; 29(10) : 455-63.

Klerman GL, Weissman MM. The changing epidemiology of depression. *Clin Chem* 1988 ; 34, 807-812.

Kulkarni MP, Juvekar AR. Attenuation of acute and chronic restraint stress induced perturbations in experimental animals by *Nelumbonucifera* Gaertn. *Indian J of Pharmaceutical Science* 2008 ; 11:327-32.

Laroche MG, Rousselet F. Les animaux de laboratoire. Ethique et bonnes pratiques.-Paris : Masson. 1990 ; p 393.



Larrère R. Justifications éthiques des préoccupations concernant le bien-être animal. INRA Prod. Anim 2007 ; 20, 11-17.

Lang RE, Heil JW, Ganten D, Hermann K, Unger T, Rascher W. Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. Neuroendocrinology 1983 ; 37(4), 314–6.

Leandro CG, Nascimento E, Azevedo MM, Viegas A, Albuquerque C, Cavalcanti CB, et al. Efeito da L-Glutamina sobre o perfil leucocitário e a função fagocítica de macrófagos de ratos estressados. Rev Nutr. 2006 ; 19(4), 437-44.

Levine S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress .Psychoneuro-endocrinology 2005 ; 30, 939–946.

Leslie R. Meek, Kristi M. Burda, Erin Paster. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. Physiology & Behavior 2000 ; 71, 543- 549.

Livingstone DE, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, Walker BR. Understanding the role of glucocorticoids in obesity: tissue-specific alterations of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. Endocrinology 2000a ; 141, 560–563.

Livingstone DWW, Jones GC, Smith K, Jamieson PM, Andrew R, Kenyon CJ, Walker BR. Understanding the role of glucocorticoid in obesity: tissue-specific alteration of corticosterone metabolism in obese Zucker rats. Endocrinology 2000b ; 141, 560–563.

Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, Bergstrom J, Alvestrand A. Effects of high doses of glucocorticoids on free amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. Eur J Clin Invest 2002 ; 32,345-53.

Lou HC, Hansen D, Nordentoft M, Pryds O, Jensen F, Nim J, et al. Prenatal stressors of human life affect fetal brain development. Dev Med Child Neurol 1994 ; 36, 826–32.

Lo Sauro C, Ravaldi C, Cabras PL, Faravelli C, Ricca V. Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders. Neuropsychobiology 2008 ; 57, 95–115.



Macmicking J, Xie QW, Nathan C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 1997 ; 15 : 323-50.

Magarinos AM, McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 1995 ; 69, 83-88.

McGowan PO, Sasaki A, D'Alessio AC, Dymov S, Labonté B, Szyf M, Turecki G, Meaney MJ. Epigenetic regulation of the glucocorticoid receptor in human brain associates with childhood abuse. *Nat. Neurosci.* 2009 ; 12, 342–348.

Mahesh VB, Brann DW. Interaction between ovarian and adrenal steroids in the regulation of gonadotropin secretion. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol* 1992 ; 41, 495-513.

Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M, Dickson SL, Seckl J, Blondeau B, Vieau D, Maccari S, Viltart O. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. *Am. J. Physiol: Endocrinol. Metab.* 2007a ; 292, E1526–E1533.

Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. *Curr. Med. Chem.* 2007 ; 14, 2918–2924.

McEwen B S. Glucocorticoids, depression, and mood disorders: structural remodeling in the brain. *Metabolism* 2005 ; 54:20–3.

Merlot E. Modulation de la production de cytokines par l'environnement social et susceptibilité aux infections. Thèse de doctorat. Institut national agronomique. paris-grignon. 2003.

Montgomery KC. The relation on skip between fear induced by novel stimulation exploratory behaviour. *J.comp.physio.* 1955 ; 48 :254-260.



Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S & Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007 ; 92, 317-339.

Morris RGM. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learn. Motiv* 1981 ; 12, 239–260.

Morilak D A ,Barrea G ,Echevarria D J, Garcia A S, Hernandez A, Ma S , Petre C O. Role of brain morepinephrine in the behavioral response to stress progress in Neuro-psycho-pharmacology and biological psychiatry 2005 ; 29, 1214-1224.

Mössner R, Mikova O, Koutsilieri E, Saoud M, Ehli AC, Müller N, Andreas J Fallgatter, Riederer P. Recommendations sur les marqueurs biologiques : marqueurs biologiques dans la dépression. *The World Journal of Biological Psychiatry* 2007 ; 8(3), 141-174.

Mueller BR, Bale TL. Impact of prenatal stress on long term body weight is dependent on timing and maternal sensitivity. *Physiol. Behav.* 2006 ; 88, 605-614.

Nakamura K , Sheps S , Arck PC. Stress and reproductive failure: past notions, present insights and future directions. *J Assist reprod genet* 2008 ; 25 (2-3), 47-62.

Nascimento E, Cavalcante T, Pereira S, Palmeira A, Rocha MC, Viana MT, et al. O exercício físico crônico altera o perfil leucocitário e a taxa de fagocitose de ratos estressados. *Rev Port Ciênc Desporto* 2004 ; 4(3), 26-33.

Neigh GN, Ritschel LA, Kilpela LS, Harrell CS, Bourke CH. Translational reciprocity: bridging the gap between preclinical studies and clinical treatment of stress effects on the adolescent brain. *neuroscience* 2013 ; 249, 139–153.

Neugebauer R, Kline J, Stein Z, ShROUT P, Warburton D, Susser M. Association of stressful life events with chromosomally normal spontaneous abortion. *Am J Epidemiol* 1996 ; 143(6), 588–96.



Newkirk MM, Goldbach-Mansky R, Lee J, Hoxworth J, McCoy A, Yarboro C, et al. Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-IgE in patients with early synovitis. *Arthritis Res Ther* 2003 ; 5, R82–90.

Mychasiuk R, Gibb R, Kolb B. Prenatal bystander stress induces neuroanatomical changes in the prefrontal cortex and hippocampus of developing rat offspring. *Brain research* 2011; 1412. Page 55–62.

Niu N, Zhang J, Guo Y, Zhao Y, Korteweg C, Gu J. Expression and distribution of immunoglobulin G and its receptors in the human nervous system. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2011a ; 43, 556–63.

Oakley AE, Breen KM, Clarke IJ, Karsch FJ, Wagenmaker ER, Tilbrook AJ. Cortisol reduces GnRH pulse frequency in follicular phase ewes: influence of ovarian steroids. *Endocrinology* 2009 ; 150, 341-349.

O'Connor TG, Heron J, Golding J, Glover V, ALSPAC Study Team. Maternal antenatal anxiety and behavioural/emotional problems in children: a test of a programming hypothesis. *J Child Psychol Psychiatry* 2003 ; 44(7), 1025–36.

Pagel MD, Smilkstein G, Regen H, et al. Psychosocial influences on new born outcomes: a controlled prospective study. *Soc Sci Med* 1990 ; 30, 597–604.

Pardon MC, Gerardin P, Joubert C, Perez-Diaz F, Cohen-Salmon C. Influence of prepartum chronic ultramild stress on maternal care behavior in mice. *Biol Psychiatr* 2000 ; 47, 858–63.

Paternain L, Batlle MA, De la Garza AL. Transcriptomic and epigenetic changes in the hypothalamus are involved in an increased susceptibility to a high-fat-sucrose diet in prenatally stressed female rats. *Neuroendocrinology* 2012 ; 96, 249–260.

Patin V, Vincent A, Lordi B, Caston J. Does prenatal stress affect the motoric development of rat pups? *Developmental Brain Research* 2004 ; 149, 85– 92.



Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 1985 ; 14(3), 149-167.

Penttinen J. Hypothesis: low serum cholesterol, suicide and interleukin-2. *Am J Epidemiol* 1995 ; 141(8), 716-718.

Pereira B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. *Motriz*. 1996 ; 2(2), 71-9

Perica MM, Delas I. Essential fatty acids and psychiatric disorders. *NutrClinPract* 2011 ; 26(4), 409-25.

Pervanidou P, Chrousos GP. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* 2011 ; 61, 611–619.

Porsolt R D, Pinchon Jalfre M. new animal model sensitive to anti depressant treatments. *Nature* 1977 ; 266, 730-732.

Purdy RH, Morrow AL, Moore PH, JR and Paul SM. Stress-induced elevations of γ -aminobutyric acid type A receptor-active steroids in the rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88, 4553–4557.

Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003 ; 463, 3-33.

Radley JJ, Rocher AB, Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dammann M, McEwen BS, Morrison JH, Wearne SL ,Hof PR. Repeated stress alters dendritic spine morphology in the rat medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol*. 2008 ; 507, 1141-1150.

Rafter D. Biochemical markers of anxiety and depression. *Psychiatry Res* 2001; 103, 93-96.

Regenthal R, Koch H, Köhler C, Preiss R, Krügel U. Depression-like deficits in rats improved by subchronic modafinil. *Psychopharmacology* 2009 ; 204, 627–39.



Rask E, Olsson T, Söderberg S, Andrew R, Livingstone DE, Johnson O, Walker BR. Tissue-specific dysregulation of cortisol metabolism in human obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001 ; 86, 1418–1421.

Rask E, Walker BR, Söderberg S, Livingstone DE, Eliasson M, Johnson O, Andrew R, Olsson T. Tissue-specific changes in peripheral cortisol metabolism in obese woman: increased adipose 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 ; 87, 3330–3336.

Ribas VR, De Lima Martins HA, Viana MT, do Nascimento Fraga S, De Oliveira Carneiro SM, De Galvão BHA, Bezerra AA, Barbosa De Castro CMM, Sougey EB, Manhães De Ricart-Jane D, Rodriguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, Lopez-Tejero M D, Llobera M. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 2002 ; 51, 925-931.

Roberts LG, Nicolich MJ, Schreiner CA. Developmental and reproductive toxicity evaluation of toluene vapor in the rat II. *Developmental Toxicity Reproductive Toxicology* 2007 ; 23, 521–531.

Rojo L, Conesa L, Bermudez O, Livianos L. Influence of stress in the onset of eating disorders: data from a two-stage epidemiologic controlled study. *Psychosom. Med* 2006 ; 68, 628–635.

Romeo RD, Lee SJ, McEwen BS. Differential stress reactivity in intact and ovariectomized prepubertal and adult female rats. *Neuroendocrinology* 2004 ; 80, 387 –393.

Roussel JD, Beatty JF, Lee JA. Influence of season and reproductive status on peripheral plasma progesterone levels in the lactating bovine. *Int. J. Biometeor* 1977 ; 21, 85-91.

Ross BM. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and anxiety disorders, Prostaglandins LeukotEssent Fatty Acids 2009 ; 81(5-6) , 309-12.



Roy BN, Reid RL, Van Vugt DA. The effects of estrogen and progesterone on corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid levels in the paraventricular nucleus and supraoptic nucleus of the rhesus monkey. *Endocrinology* 1999 ; 140, 2191–2198.

Roy V. Contribution à l'étude de conduites émotionnelles chez le rat : utilisation du handling postnatal et de l'approche éthoexpérimental du comportement, thèse de doctorat université de Rouen, France. 2002.

Ruder E H , Terryl J H, Jeffrey B, Goldman M B. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Hum Rep Update AdvAcc* 2008 ; 4 : 345-57.

Rushen J. Changing concepts of farm animal welfare: bridging the gap between applied and basic research. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 81 199-214.

Saraswathi CD, sathyanarayan sreemantula DR, wagh sagar prakash. Effect of chronic cold restraint and immobilization stress on estrous cycle in rats. *Pharmacologyonline* 2010 ; 2: 151-160.

Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease : 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007 ; 115, 450–458.

Scanlon SM, Williams DC, Schloss P. Membrane cholesterol modulates serotonin transporter activity. *Biochemistry* 2001 ; 3, 10507 - 10513.

Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998 ; 22, 1197-1215.

Seyle H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936 ; 138:32.



Selye H. The stress of life, 2d edition ed: Papermark Edition. 1976.

Shaikh A, Shaikh SA. Adrenal and ovarian steroid secretion in the rat estrous cycle temporally related to gonadotropins and steroid levels found in peripheral plasma. *Endocrinology* 1975 ; 96, 37–44.

Sheikh N, Farhadi nasab A, Araghchian M, Manikashani KH. The relationship of cholesterol and triglyceride with depression. *Acta Medica Iranica* 2004 ; 42(3), 185-187.

Shuichi C, Tadahiro N, Midori N, Misty C R, Chisato W, Hiroshi K. Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex. *Progress in NeuroPsychopharmacology and Biological Psychiatry* 2012 ; 39, 112-119.

Smith SM, Vale WW, The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to Stress. *Dialogues Clin. Neurosci* 2006 ; 8, 383-395.

Spandrio S, Sleiman I, Scalvini T, et al. Lipoprotein (a) in thyroid dysfunction before and after treatment. *HormMetab Res* 1993 ; 25, 586-9.

Stackpole CA, Clarke IJ, Breen KM, Turner AI, Karsch FJ, Tilbrook AJ. Sex differences in the suppressive effect of cortisol on pulsatile secretion in luteinizing hormone in sheep. *Endocrinology* 2006 ; 147, 5921-5931.

Steele TA. Chemotherapy-induced immunosuppression and reconstitution of immune function. *Leukemia Res* 2002 ; 26, 411-4.

Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* 1996 ; 17, 221-44.



Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, A Henn F, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology* 2004 ; 29, 2007–2017.

Swiergiel AH, Zhou Dunn AJ. effects of chronic footshock, restraint and corticotropin-releasing factor on freezing, ultrasonic vocalization and forced swim behavior in rats. *Behav Brain Res* 2007 ; 183, 178-87.

Takuma K, Mizoguchi H, Funatsu Y, Hoshina Y, Himeno Y, Fukuzaki E, Kitahara E, Arai S, Ibi D, Kamei H, Matsuda T, Koike K, Inoue M, Nagai T, Yamada K. Combination of chronic stress and ovariectomy causes conditioned fear memory deficits and hippocampal cholinergic neuronal loss in mice. *Neuroscience* 2012 ; 207, Pages 261–273

Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman M F, McArthur MD, Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 1997 ; 273, E1168-77.

Taveras EM, Gillman MW, Kleinman K. Racial/ethnic differences in early-life risk factors for childhood obesity. *Pediatrics* 2010 ; 125 , 686–695.

Tempel DL, Leibowitz SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 1994 ; 6, 479-501.

Terao T, Nakamura J, Yoshimura R, Ohmori O, Takahashi N, Kojima H, Soeda S, Shinkai T, Nakano H, Okuno T. Relationship between serum cholesterol levels and metachlorophenylpiperazine-induced cortisol responses in healthy men and women. *Psychiatry Research* 2000 ; 96, 167–173.

Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals. The role of glucocorticoids and sex differences. *Rev. Reprod* 2000 ; 5, 105–113.

Tobach E. Manipulation effects, open-field experience and digestive transit time in Wistar male and female rats. *Psychol Rep* 1966 ; 19 (2), 375-378.



Trinder R. determination of glucose in blood using acceptor .Ann. Clin. Biochem 1969 ; 6, 24-24.

Torres SJ, Nowson CA. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. Nutrition 2007 ; 23 (11-12), 887-94.

Trickey D, Siddaway AP, Meiser-Stedman R, Serpell L, Field AP. A meta-analysis of risk factors for post-traumatic stress disorder in children and adolescents. Clin Psychol Rev 2012 ; 32, pp. 122–138.

Vaissaire JP. Sexualité et Reproduction des mammifères domestiques et de laboratoire. Paris .Maloine Editeur. 1977 ; 457 p.

Vann SD, Albasser M M, Hippocampus and neocortex: recognition and spatial memory. CurrOpin Neurobiol 2011 ; 21(3): 440-5.

Van Lier E, Akerberg S, Meikle A, Pérez-Clariget R, Forsberg M, Sahlin L. Sex differences in ACTH-induced cortisol secretion and adrenal oestrogen receptor content in sheep. In: Proceedings of the Paper Presented at the Fourth International Conference on Farm Animal Endocrinology, Salsomaggiore, Parma, Italy. 2001b.

Veenema AH, Neumann ID. Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. Brain Behav Evol 2007 ; 70, 274-85.

Veissier I, Beaumont C & Lévy F. Les recherches sur le bien-être animal : buts, méthodologie et finalité.INRA Prod. Anim 2007 ; 20, 3-10.

Vevera J, Zukov I, Morcine T, Papezova H. Cholesterol concentrations in violent and non-violent women suicide attempters. European Psychiatry 2003 ; 18, 23–27.

Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. J Neurosci 2002 ; 22, 6810–8.



Watt TT, Appel L, Roberts K. Sugar, Stress, and the Supplemental Nutrition Assistance Program: Early childhood obesity risks among a clinic-based sample of low-income Hispanics. *J Community Health* 2013 ; 38(3) , 513-20.

Wagenmaker ER, Breen KM, Oakley AE, Tilbrook AJ, Karsch FJ. Psychosocial stress inhibits amplitude of gonadotropin-releasing hormone pulses. Independent of cortisol action on the type II glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 2009 ; 150, 762-769.

Weiss A, Herzig A, Jacobs H, Lehner CF. Continuous cyclin E expression inhibits progression through endoreduplication cycles in *Drosophila*. *Curr. Biol* 1998 ; 8, 239-242.

Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *Eur J Neurosci* 2000 ; 12, 1047-54.

Welberg LA, Seckl JR, Holmes MC. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 2001 ; 104, 71–79.

Whicher JT, Price CP, Spencer K. Immunonephelometric and immunoturbidimetric assays for proteins. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1983 ; 18 : 213-60.

Xu Y, Lin D, Li S, Shyamala SG, Barish PA, Vernon MM, et al. Curcumin reverses impaired cognition and neuronal plasticity induced by chronic stress. *Neuropharmacology* 2009 ; 57, 463–71.

Yehuda R. Post-traumatic stress disorder. *N. Engl. J. Med* 2002 ; 346, 108-114.



Yi L, Xuemei Z, Lingshan G, Xin L, Xia T, Ling L, Youguang Z, Ling Z, Xiaoxing Y . Protective effects of nifedipine administration on the cognitive impairments induced by chronic restraint stress in mice. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2013 ; 103, 474–480.

Yong L, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions. *Progress in Neurobiology* 2012 ; 98 ,145–165.

Zhang LJ, Xue YQ, Yang C, Yang WH, Chen L, Zhang QJ, et al. Human albumin prevents 6-hydroxydopamine-induced loss of tyrosine hydroxylase in in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 2012b ; 7:e41226.