



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne démocratique et populaire  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique  
جامعة باجي مختار-عنابة  
Université Badji Mokhtar- Annaba



Faculté des sciences  
Département de biochimie

Laboratoire de biochimie et de microbiologie appliquée à la santé et à  
l'agroalimentaire

### THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

En Biochimie

Option : Biochimie appliquée

### THEME

**Riposte biochimique et neurophysiologique suite à un stress  
sonore chez le rat Wistar**

**Présentée par :**

Mlle. BADACHE Soumeya

**Devant le jury :**

**Président :** M. LADJAMA Ali, Professeur, Université d'Annaba  
**Directeur de thèse :** M. BAÏRI Abdel Madjid, Professeur, Université d'Annaba  
**Examineur :** M. ACHOU Mohamed, Professeur, Université d'Annaba  
**Examinatrice :** Mme. TADJINE Aïcha, Professeur, Université d'El Tarf  
**Examinatrice :** Mme. BOUKHROUFA Feriel, MCA, Université d'Annaba

N° DB...../2017

Année universitaire : 2016-2017

## REMERCIEMENTS

*Enfin, je suis arrivée à la rédaction de la partie la plus distrayante! .....*

*Depuis le début de la rédaction de ma thèse, j'avais la terrible impression d'être seule comme au bout milieu du désert, à courir derrière un mirage. Mais en arrivant à la partie « remerciement », ce désert se peuple soudainement, et un oasis paradisiaque jaillisse miraculeusement pour apaiser l'âme et l'esprit. C'est à ce moment là que je me rend compte que le mirage en fait était bien cette impression, et je m'aperçois à quel point j'étais merveilleusement entouré et soutenue.*

*Si seulement je peux remercier le « Remerciement » même, pour les beaux souvenirs qu'il a ravivé en moi! Grâce à cette partie, j'ai redéfilé toutes ces années consacrées à la réalisation d'un rêve enfantin...*

*Avec beaucoup d'émotions, j'ai passé en revue un parcours que je me permets de qualifier d'exceptionnel ; exceptionnel par les personnes que j'ai rencontrées... par les expériences et les entraves qui m'ont consolidée et rendue plus forte ... par les éclats de rire et les moments de joie qui déchiraient le désespoir comme déchire l'éclair l'obscurité de la nuit... par les escapades qui m'ont enrichie tant sur le plan culturel et professionnel que personnel et humain, et qui m'ont redonné de l'énergie et du souffle.*

*Tant de monde à remercier, j'espère n'oublier personne...*

*Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à Professeur **LADJAMAA Ali** d'avoir accepté de présider le jury de cette thèse. Mes remerciements vont aussi à Professeur **ACHOU Mohamed**, Professeur **TADJINE Aïcha** et Docteur **BOUKHROUFA Ferial** d'avoir accepté d'examiner ma thèse.*

*Toute ma reconnaissance et mes profonds remerciements vont à Professeur **BAÏRI Abdel Madjid**, mon directeur de thèse, pour sa disponibilité, son soutien, pour le temps qu'il m'a consacré pour me remettre sur les rails à chaque fois je perdais le fil... J'ai eu le grand privilège d'avoir des discussions très riches avec lui et qui m'ont fait découvrir quelques facettes des arcanes mystérieux du système nerveux et m'ont permis de clarifier ma pensée parfois embrouillée sur ma thématique.*

*Je remercie une seconde fois mon directeur de laboratoire, le Professeur **LADJAMA Ali**, de m'avoir permis la réalisation de mes travaux dans son laboratoire de recherche et pour ses encouragements tout au long de mon parcours.*

*J'adresse également toute ma gratitude la plus sincère qui soit, à Docteur **BOUSLAMA Slim**, que j'ai eu la chance d'être son étudiante durant presque tout mon parcours universitaire. Cela fait déjà onze ans que vous me prodiguez généreusement et incessamment vos précieux conseils et vous m'aidiez inconditionnellement avant même que je le demande. Ce fût un énorme plaisir de vous côtoyer Maître!*

*Je remercie du fond du cœur toute l'équipe du laboratoire de biochimie et microbiologie appliquée, anciens et novices et toutes les équipes limitrophes au département de biochimie ou ailleurs pour leur soutien et gentillesse. Je ne peux m'empêcher d'adresser mes plus sincères remerciements à **TICHATI Lazhar** pour son assistance et ses conseils techniques qui m'ont beaucoup aidé dans mes manipulations.*

*Un très grand merci à l'équipe de PAVAL lab et l'équipe de GIN de Grenoble, France pour son chaleureux accueil et pour les bons moments qu'on a passé ensemble. Dimitri, merci pour les longues discussions dans le couloir à chercher les meilleures solutions aux pépins de mes manip... Deepa, merci pour ta bonté et tes précieux conseils de rédaction et ta correction d'anglais... Semaa, merci pour les moments de folie qu'on a vécus ensemble... Maha, je n'oublierai jamais tes grands services... Abdel, merci pour ta disponibilité et ton soutien.... Christophe, je te dois tellement de choses que ne peux tout citer, merci*

*pour ta bonté et ton soutien inconditionnel aux pires moments de ma formation, j'ai appris beaucoup de choses en matière d'IHC grâce à toi, tu m'as aussi appris qu'un chercheur qui se respecte doit être un humain tout d'abord car science sans conscience n'est que ruine de l'âme... John, ce fût un grand plaisir d'échanger avec toi sur des sujets « existentiels ».....Dr. CHEBLOUNE, merci pour tout !*

*Mille mercis à ma deuxième famille, mes chers amis, LEKOUAGHET Asma, KEROUAZ Bilal, GUELLATI Fatma, OUAZOUAZ Meriem, TEBANI Meriem, je vous remercie pour vos coups de pouces et vos encouragements qui m'ont aidé à me relever et me remettre sur pieds. Vous étiez une vraie source d'inspiration et vous le resterez à jamais.*

*Le tour est à ma chère famille maintenant, petite et grande.....mais hélas, tous les mots m'échappent.... Jamais je ne saurai vous remercier pour tout ce que vous avez fait pour faire de moi ce que je suis devenue. Vous êtes l'essence de ma réussite, la source de mon inspiration, l'âme de mon courage et le fuel de ma motivation.*

*Très chers parents, votre amour, vos soins et votre soutien m'ont accompagné tout au long de ces années et votre lanterne a toujours éclairé ma voie vers les plus beaux horizons. J'espère que je suis à la hauteur de vos espérances et vos attentes, votre satisfaction m'est tellement chère. Je vous remercie de tout mon coeur....Meriem ma sœur, Billel petit frère, merci pour votre soutien et votre affection.*

*Un grand merci à mes oncles, tantes, cousins et cousines, d'avoir cru en moi, merci pour votre soutien indéfectible aux moments difficiles. ...*

*Kheireddine, Toufik et Lotfi....Bonne nouvelle ...Plus de carboglace ! Je vous remercie infiniment d'avoir été à la fois des cousins et des frères pour moi... J'espère avoir su vous honorer par ce modeste travail*

*Et enfin, ce travail n'aurait jamais pu être réalisé que grâce à vous, mes petits **rats blondino** ! J'oublierai jamais les moments, euh plutôt les années, que j'ai passées avec vous à décrypter et à découvrir les méandres du comportement murin, une facette qui ne doit pas être dissociée de l'étude de la physiologie.*

*Je dédie ce travail à toutes les personnes qui me sont chères...*

A la mémoire de mon très cher oncle regretté...Mohamed

J'aurais aimé que tu sois là ....

A mes très chers parents...

A Notre Jean D'Arc... La combattante Amel

A ma famille...

« Confronté à la roche, le ruisseau l'emporte toujours, non par la force,  
mais par la persévérance »

Confucius

## ABSTRACT

In this work, we aimed to investigate in adolescent rats the individual and combined effects of prenatal noise and restraint stress on balance control, exploration, locomotion, olfactory ability and anxiety behavior. We also examined the effect of these three types of stressor on glycemia, lipidic profil and hepatic enzymes. Peripheral circulating immun cells and central expression of receptors of Interleukin 2 (IL2R) were evaluated in the aim to establish the relationship between behavioral alterations and the immune system.

Indeed, three groups of pregnant rats were exposed to daily repeated stress from day 11 to day 19 of pregnancy: 3 min noise (Noise Stress: NS); 10 min restraint (Restraint Stress: RS); or 3 min noise followed by 10 min restraint (Mixed Stress, MS). On postnatal days (PND)10, 44, 45 and 46, four groups of male rats (Control, NS, RS, MS; 16 rats each), were tested as follows:1) Olfactory test, 2) Beam walking (BW), 3) Open Field (OF), and 4) Elevated plus maze (EPM). At PND 48, rats were euthanized, and blood was collected. Brain were extracted and conserved by snapfreezing for immunohistochemistry staining.

Our results show that all investigated parameters were highly affected by NS, except anxiety level wich was highly increased in MS. Hence, combined prenatal stressors exert non-additive effects on locomotion, exploration and balance control, but induce greater anxiety through additive effects. In addition, immune system as well as ACTH plasma concentration showed to be affected by prenatal stress, especially by noise, which group had the largest adrenal glands. Additionally, IHC revealed a correlation between amount of IL2R expression and behavioral alteration in several brain regions, suggesting IL2 might have a key role in neurobehavioral modulation.

Overall, contrary to expectation, combined prenatal stressors can interact to increase anxiety level, but diminish behavioral alterations of exploration, locomotion and impaired balance control which were strongly induced by noise stress. Further studies are necessary to explain how multiple stressors interact to induce less effect than individual stressors.

**Key words:** Prenatal stress, noise, multiple stress, balance, interleukin 2 receptors, behavior.

## RESUME

Dans ce travail, nous avons recherché les effets d'une application individuelle ou combinée du stress sonore et du stress de contention sur le contrôle de l'équilibre, l'exploration, la locomotion, les performances olfactive et le comportement anxieux du Rat juvénile. Nous avons également évalué l'effet de ces trois types de stress sur la glycémie, le profil lipidique et les enzymes hépatiques. Les cellules immunes circulantes et l'expression centrale des récepteurs à interleukine 2 (IL2R) ont été évaluées dans le but d'établir la relation entre les altérations comportementales et le système immunitaire.

En effet, trois groupes de rattes gestantes primipares ont été exposés à un stress quotidien répété du jour 11 au 19 de la gestation: 3 min de son (110dB)(Stress sonore: SS); 10 min de contention (SC); Ou 3 minutes de son suivies d'une contrainte de 10 minutes (Stress mixte, SM). Aux jours postnataux (JPN) suivant: 10, 44, 45 et 46, le comportement de quatre groupes de rats mâles de la progéniture (Témoin, SS, SC, SM, 16 rats chacun) a été évalué comme suit: 1) Test olfactif, 2) Test du mât arrêté (*Beam Walking* : BW) , 3) Test du champ ouvert (*Open Field* : OF), et 4) plus de labyrinthe plus élevé (*Elevated plus maze* : EPM) respectivement. A JPN 48, les rats ont été euthanasiés et le sang a été recueilli. Le cerveau a été extrait et conservé par snapfreezing pour l'étude immunohistochimique des IL2R ultérieure. Nos résultats montrent que tous les paramètres étudiés ont été fortement affectés par le stress sonore, à l'exception du degré d'anxiété qui a été plus prononcé dans le groupe SM. Notre paradigme de stress mixte a induit des effets non additifs sur tous les paramètres étudiés sauf le degré d'anxiété qui semble être plutôt amplifié. En outre, le système immunitaire ainsi que le taux plasmatique d'ACTH ont également été affectés par le stress prénatal, notamment par le stress sonore, d'ailleurs les surrénales de ce groupes ont connu une hypertrophie par rapport au témoin. De plus, l'IHC a révélé une corrélation entre la taux d'expression des l'IL2R et l'altération du comportement dans plusieurs régions du cerveau, ce qui suggère que l'IL2 pourrait jouer un rôle clé dans la modulation neurocomportementale.

Globalement, et contrairement à nos attentes, les éléments du stress multiple peuvent interagir pour augmenter le niveau d'anxiété, mais diminuent les altérations comportementales et physiologique de l'exploration qui ont été fortement induites par le stress sonore appliqué seul. D'autres études sont nécessaires pour expliquer les mécanismes moléculaires avec lesquelles les éléments du stress multiple interagissent pour induire moins d'effets qu'un stress individuel.

**Mots clés** : Stress prénatal, sonore, stress multiple, récepteur à interleukine 2, comportement.

## ملخص

في إطار هذا العمل، قمنا بدراسة الآثار المترتبة عن التعرض للإجهاد المزمن في فترة الحمل و ذلك على الجانب النفسي (درجة الكآبة)، توازن الجسم، الاستكشاف، الحركة وأداء حاسة الشم عند الفئران في سن المراهقة. قمنا أيضا بتقييم تأثير 3 أنواع مختلفة من الإجهاد على نسبة السكر في الدم، الدهون وإنزيمات الكبد. تركيز الخلايا المناعية والتعبير عن مستقبلات انترلوكين 2 (IL2R) على مستوى المخ تم تقييمها من أجل تأطير علاقة بين التغيرات السلوكية والجهاز المناعي.

تعرضت ثلاث مجموعات من الفئران الحوامل لأول مرة، إلى 3 أنواع من الإجهاد اليومي المتكرر من يوم 11 إلى 19 من الحمل: 3 دقائق من الضجيج (DB110) (اجهاد الصوت: SS)؛ اجهاد عن طريق التثبيت 10 دقيقة (SC)؛ وأخيرا اجهاد بتطبيق النوعين السابقين: 3 دقائق من الضجيج متبوعة ب 10 دقيقة من التثبيت (الإجهاد مختلط SM). عند بلوغ الفئران عمر: 10، 44، 45 و 46 بعد الولادة تم تقييم سلوك الفئران الذكور و مقارنتها مع مجموعة الشاهد على في اطار الإختبارات التالية: 1) اختبار التعرف على رائحة العشب (2) إختبار التوازن بالمشي على الشريط المثبت، (3) اختبار الحقل المفتوح، و (4) اختبار المتاهة المرفوعة. عند بلوغ الفئران عمر 48 يوم، تمت عملية سحب الدم منها باستعمال مخدر ثم إستخراج المخ والإحتفاظ به عن طريق التجميد السريع snapfreezing بغرض دراسة التعبير الجيني لمستقبلات الأنترلوكين 2 على مستوى المخ للدراسة. نتائجنا تظهر أن جميع القياسات تأثرت بشدة في مجموعة الإجهاد بالضجيج، على عكس نموذج الإجهاد المختلط الذي أدى إلى تقليص الآثار السلبية في جميع القياسات باستثناء درجة القلق التي كانت الأعلى في هذه المجموعة. وبالإضافة إلى ذلك، تأثر الجهاز المناعي وACTH الدموية أيضا في جميع مجموعات الإجهاد ما قبل الولادة، و خاصة الإجهاد بالضجيج الذي أدى بدوره إلى زيادة في حجم الغدة الكظرية مقارنة بمجموعة الشاهد. وبالإضافة إلى ذلك، كشفت IHC وجود علاقة بين مستويات التعبير الجيني لمستقبلات الأنترلوكين 2 في العديد من مناطق الدماغ و التغيرات السلوكية الملاحظة ، مما يشير إلى أن IL-2 قد تلعب دورا رئيسيا في تعديل السلوك العصبي.

عموما، وخلافا لتوقعاتنا، التعرض لعدة أنواع من الإجهادات قد يؤدي الى ظهور تغيرات سلوكية و فيزيولوجية طفيفة، لكن من الواضح أن هذه الإجهادات تتفاعل لزيادة مستوى القلق مقارنة بالتعرض لإجهاد الصوت لوحده. وهناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتوضيح الآليات الجزيئية التي تؤدي الى تقليص الإضطرابات السلوكية و الفيزيولوجية لدى الفئران عند التعرض للإجهادات متعددة مقارنة مع الإجهاد الفردي.

**كلمات المفتاح:** الإجهاد قبل الولادة، الضجيج، الإجهادات المتعددة، مستقبلات الانترلوكين 2 ، السلوك.

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Différentes combinaisons d'anticorps primaires et secondaires utilisées.....	34
<b>Tableau 2</b> : Taux plasmatiques des transaminases ASAT et ALAT (UI/l).....	50
<b>Tableau 3</b> : Concentration de certaines cellules immunitaires circulantes ( $10^3$ cellules/ $\mu$ l).....	52
<b>Tableau 4</b> : Comptage de cellules marquées à l'anti CD25 dans différentes régions cérébrales. Le nombre de cellules est exprimé par : Cellule/champs optique. ....	56

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Organisation du système olfactif du rat.....	5
<b>Figure 2</b> : Observation microscopique des stades œstraux de la rate Wistar Albinos .....	11
<b>Figure 3</b> : Schéma illustrant le protocole expérimental mené sur les rates gestantes .....	12
<b>Figure 4</b> : Dispositif du stress sonore .....	13
<b>Figure 5</b> : Système de contention .....	13
<b>Figure 6</b> : Schéma illustrant le protocole du traitement de la progéniture.....	15
<b>Figure 7</b> : Test du champ ouvert ( <i>Open field</i> ) .....	16
<b>Figure 8</b> : Test de la croix surélevée ( <i>elevated plus maze</i> ).....	17
<b>Figure 9</b> : Dispositif du mât arrêté ; test de l'équilibre en conditions statiques.....	18
<b>Figure 10</b> : Technique de prélèvement rétroorbitaire.....	19
<b>Figure 11</b> : Principe ELISA en sandwich.....	20
<b>Figure 12</b> : Structure du crâne du rat et points d'incision réalisés en vue de l'extraction .....	27
du cerveau, désignés par des pointillés entre les points Lambda et Bregma. Tiré de " <i>The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition</i> ", George PAXINOS et Charles WATSON.	
<b>Figure 13</b> : Snapfreezing des échantillons et conservation pour une IHC.....	28
<b>Figure 14</b> : Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : .....	29
Bregma 3.24 mm). Localisation du cortex préfrontal. Tiré de " <i>The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition</i> ", George PAXINOS et Charles WATSON.	
<b>Figure 15</b> : Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : .....	30
Bregma 2.52 mm). Localisation du striatum ( <i>caudal putamen</i> ). Tiré de " <i>The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition</i> ", George PAXINOS et Charles WATSON.	
<b>Figure 16</b> : Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : .....	31
Bregma -3.36 mm). Localisation de l'hippocampe. Tiré de " <i>The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition</i> ", George PAXINOS et Charles WATSON.	

<b>Figure 17</b> : Description des étapes de la confection des microsections au cryostat...	33
<b>Figure 18</b> : Concentration plasmatique de l'ACTH en pg/ml dans les quatre groupes expérimentaux. ACTH : hormone adénocorticotrope	38
<b>Figure 19</b> : Poids relatif moyen des glandes surrénales en (g) dans les 4 groupes de rat	39
<b>Figure 20</b> : Variation des paramètres du test du champ ouvert; Temps passé dans les coins (secondes ) (A), nombre de cases traversées (B), temps passé au centre par secondes, (C) et temps de redressement par secondes (D).	41
<b>Figure 21</b> : Variation des paramètres du test de la croix surélevée; Temps passé dans les bras ouverts par seconde (A), temps de redressement par secondes (B).	42
<b>Figure 22</b> : Variation des paramètres du test du mât arrêté; Temps pris pour traverser le mât par secondes (A), nombre de faux-pas sur la barre du mât arrêté (B).	43
<b>Figure 23</b> : Variations du temps de latence par secondes dans le test olfactif enregistrées dans les 4 groupes expérimentaux	44
<b>Figure 24</b> : Fluctuation du poids corporel moyen (g) dans les 4 groupes expérimentaux (A), et courbe de tendance de la fluctuation du poids corporel moyen (B).	45
<b>Figure 25</b> : Taux de glycémie ( mmole/l) enregistrée dans les 4 groupes expérimentaux.	46
<b>Figure 26</b> : Taux plasmatique du cholestérol (mmole/l) dans les 4 groupes expérimentaux.	47
<b>Figure 27</b> : Taux plasmatique des Triglycérides (mmole/l) dans les 4 groupes expérimentaux.	48
<b>Figure 28</b> : Taux plasmatique de HDL-cholestérol (A) et LDL-cholestérol (B) (mmole/l) dans les 4 groupes expérimentaux.	49
<b>Figure 29</b> : Taux plasmatique des transaminases : Aspartate Amino Transaminase (A) et Alanine Amino Transférase (B) dans les 4 groupes expérimentaux.	50
<b>Figure 30</b> : Numération sanguine de cellules immunitaires circulantes dans les 4 groupes expérimentaux.	51
<b>Figure 31</b> . Observation microscopique des microsections sous lumière visible (Olympus CKX41, grossissement : 100X). A : Cortex moteur (CxM), B : Striatum	53

(*Caudal putamen*: CPu, CC: corpus callosum), C : hippocampe (Corne d'Ammon: CA1, CA2 et CA3).

- Figure 32** : Immunodétection par fluorescence de l'expression.....55  
des CD25 dans des microsections du cerveau des rats juvéniles stressés in utero.
- Figure 33** : L'axe HPA d'une progéniture normal (à gauche), et prénatalement.....60  
stressée par un traitement à la dexaméthazone (DEX), sous-alimentation  
(*Underfeeding* : UN) ou un régime hypoprotéique (*Low Protein Diet* : LPD).
- Figure 34** : Effets des soins maternels sur la programmation épigénétique.....62  
des gènes codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes (GR).
- Figure 35** : Principales anomalies lipidiques au cours d'une résistance à l'insuline.....72  
et du syndrome métabolique.
- Figure 36** : Effets des événements stressant dans la vie précoce de l'individu sur.....74  
le métabolisme énergétique.
- Figure 37** : Voies de la stéroïdogénèse incluant la synthèse du cortisol.....75
- Figure 38** : Mécanisme moléculaire de l'activation de transcription des gènes .....80  
« anti-inflammatoires » et la désactivation de la voie NFkB par  
les glucocorticoïdes via acétylation et désacétylation des histones.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**11  $\beta$  HSD:** 11  $\beta$  Hydroxy steroid dehydrogenase

**5 HT:** 5 Hydroxy tryptamine

**ACTH:** Adeno corticotrophic hormone

**ALAT:** Alanine amino transt rase

**ANOVA:** Analysis of variation

**ASAT:** Aspartate amino transférase

**BW :** beam walking test

**CD25:** Cluster de differentiation 25

**CP:** Caudal putamen

**CRF:** Corticotropine releasing factor

**CxM1:** Cortex moteur 1

**D1:** récepteur à dopamine de type 1

**DA:** Dopamine

**DMSO:** Dimethyl sulfooxyde

**EDTA:** Ethylène diamine tetra acetic

**EMP :** Elevated plus maze

**FBS:** Foetal bovine serum

**FNS:** Formule numérique sanguine

**GC:** Glucocorticoïdes

**GR:** Glucocorticoid receptor

**HAT:** Histone acetyl transeferase

**HDAC:** Histone deacetylase

**HDL:** High density lipoprotein

**Hipp:** Hippocampe

**HPA:** Hypothalamo pituitary adrenal axis

**11  $\beta$  HSD:** 11  $\beta$  hydroxy steroid dehydrogenase

**IFN $\gamma$ :** Interferon gamma

**IHC** : Immunohistochimie  
**IL2** : Interleukine 2  
**IL2R** : Interleukin 2 receptor  
**LDL** : Low density lipoprotein  
**MC** : Minéralocorticoïdes  
**MR** : Mineralocorticoids receptor  
**NCx**: Néocortex  
**NFκB**: Necrosis Factor kappa B  
**NPV**: Noyau paraventriculaire  
**OCT**: Optimum cutting temperature  
**OF**: Open field test  
**OMS**: organisation mondiale de la santé  
**PBS**: Phosphate Buffred Saline  
**PEPCK**: Phospho énoL pyruvate carboxy kinase  
**PFA** : Paraformaldéhyde  
**PfC**: Prefrontal cortex  
**PEG**: Poluéthylèneglycol  
**PPARγ**: Peroxisome proliferator activated receptor gamma  
**POMC**: Proopiomelanocortine  
**PTSD**: Post traumatic stress disorder  
**SNC**: Système nerveux central  
**TG**: Triglycérides  
**TNFα**: Tumor necrosis factor alpha

## TABLE DES MATIERES

Remerciements	
Résumés	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Table des matières	
I. Introduction générale.....	01
II. Matériel & Méthodes .....	09
1. Modèle animal et élevage.....	10
1.1. Mise en gestation et stress gestationnel.....	10
1.2. Traitement des femelles gestantes.....	11
1.2.1. Stress sonore.....	12
1.2.2. Stress de contention.....	13
1.2.3. Stress mixte.....	14
1.3. Traitement de la progéniture.....	14
1.3.1. Etude comportementale.....	15
1.3.1.1. Test du test du champ ouvert ( <i>open field test</i> ).....	15
1.3.1.2. Test de la croix surélevée ( <i>Elevated plus maze</i> ).....	16
1.3.1.3. Test olfactif (reconnaissance du nid).....	17
1.3.1.4. Test du mat arrêté ( <i>Beam walking test</i> ).....	18
1.3.2. Prélèvement sanguin et dosage plasmatique.....	19
1.3.2.1. Dosage de l'hormone adénocorticotrope.....	19
1.3.2.2. Dosage des paramètres biochimiques.....	20
1.3.2.2.1. Glycémie.....	20
1.3.2.2.2. Cholestérolémie.....	21
1.3.2.2.3. Triglycéridémie.....	21
1.3.2.2.4. HDL-Cholestérolémie.....	22
1.3.2.2.5. LDL-Cholestérolémie.....	23
1.3.2.2.6. Transaminases ASAT et ALAT.....	24
1.3.2.2.7. Formule numérique sanguine.....	25
1.3.3. Prélèvement d'organes.....	25
1.3.3.1. Extraction du cerveau et conservation par snapfreez.....	26
1.3.3.2. Technique d'immunohistochimie.....	28
A. Fixation.....	28
B. Confection des microsections.....	29
C. Immunohistochimie par fluorescence indirecte.....	33
2. Etude statistique.....	35

III.	Résultats.....	37
1.	Concentration plasmatique basale de l'ACTH.....	38
2.	Poids relatifs des glandes surrénales.....	39
3.	Etude comportementale.....	40
3.1.	Test du champ ouvert.....	40
3.2.	Test de la croix surélevée.....	42
3.3.	Test du mât arrêté.....	43
3.4.	Test olfactif : reconnaissance de l'odeur maternel.....	44
4.	Paramètres physiologiques et biochimiques.....	45
4.1.	Fluctuation du poids corporel.....	45
4.2.	Glycémie.....	46
4.3.	Cholestérolémie.....	47
4.4.	Triglycéridémie.....	48
4.5.	HDL- et LDL-cholestérolémie.....	49
4.6.	Transaminases : ASAT et ALAT.....	50
4.7.	Formule numérique sanguine.....	51
5.	Détection des CD25 par immunohistochimie.....	52
IV.	Discussion générale.....	57
1.	ACTH et poids relatif des surrénales.....	60
2.	Test du champ ouvert et de la croix surélevé.....	63
3.	Test du mât arrêté.....	65
4.	Test olfactif.....	67
5.	Paramètres physiologiques et biochimiques.....	69
6.	Glycémie et dyslipidémie.....	70
7.	Cholestérolémie.....	74
8.	Transaminases.....	76
9.	Immunohistochimie.....	82
V.	Conclusion et perspectives.....	86
VI.	Références bibliographiques.....	89
VII.	Annexes.....	100

# **INTRODUCTION GENERALE**

Depuis la nuit des temps, le stress environnemental est omniprésent dans la vie de l'Homme et n'apparaît pas sans conséquence sur son état de santé. Par exemple, le bruit ambiant (véhicules, trafic routier, milieu de travail) n'est généralement pas menaçant, mais il peut représenter une gêne subjective considérable et un facteur de stress qui pourrait conduire à des troubles psychosomatiques [1]. Un état de stress prolongé peut non seulement induire un comportement inhabituel et contre productif mais aussi une dégradation de l'état général de santé tel que l'apparition de la dépression qui est généralement accompagnée d'idées suicidaires. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), la dépression est la première cause d'incapacité dans le monde touchant plus de 300 millions de personnes et chaque année, plus de 800 000 personnes meurent en se suicidant. Le suicide est la deuxième cause de mortalité chez les personnes de 19 à 25 ans [2].

Le sentiment de ne pas pouvoir échapper à un bruit ou une situation contraignante imposée auquel on est sensible, constitue une source de souffrance qui mobilisera de multiples réactions de l'organisme conduisant à un état de stress, orchestré par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (hypothalamus-pituitary-adrenal : HPA). Cette riposte est déclenchée dans le but d'adapter l'organisme et ses besoins énergétiques à une situation reconnue comme contraignante. En 1936, Selye a souligné que la riposte de notre organisme à un stress comporte une double réponse : la première est spécifique et répond aux exigences de la situation stressante et de son environnement, tandis que la seconde est non spécifique, identique dans toutes les situations de stress [3, 4]. Cette dernière est innée et se déclenche dès que l'homéostasie est perturbée dans le but de sa restauration [4].

Une sollicitation prolongée de cette barrière de défense par un stimulus stressant, mène à son altération. On parle donc d'un stress chronique. En effet, l'activation chronique de l'axe HPA peut engendrer par ses neurotransmetteurs, le dysfonctionnement de plusieurs processus neurophysiologiques tels que le sommeil, la mémoire, l'apprentissage, la motivation, l'humeur...etc [5]. Par ailleurs et au regard du rôle crucial de l'axe HPA dans la régulation du système immunitaire, ce dernier ne semble pas être à l'abri des répercussions délétères d'une hyperactivité de l'axe corticotrope. A côté de cela, il existe une grande interaction entre ces deux grands systèmes. En effet, des récepteurs des glucocorticoïdes sont exprimés par des cellules immunitaires d'une part, et des terminaisons nerveuses cholinergiques et sympathiques se trouvent au niveau des ganglions lymphatiques d'une autre part.

Par ailleurs, l'aspect transgénérationnel du stress a attiré beaucoup d'attention dans la communauté scientifique [6]. Cette notion ne semble pas être nouvelle car Nikolai Studentsov, l'un des coéquipiers de Pavlov, avait entrepris une série d'expériences sur des souris (1921-1923) en les conditionnant à courir vers le mangeoire après un stimulus sonore [7]. Studentsov avait remarqué que le premier groupe de souris avait besoin de 298 répétitions pour développer ce réflexe. La deuxième génération avait besoin de 114 répétitions, la troisième : 29 répétitions alors que la quatrième génération lui suffisaient seulement 6 répétitions pour avoir ce réflexe [7]. Il conclut que les caractères acquis peuvent se transmettre d'une génération à une autre. Un mécanisme d'habituation à caractère transmissible s'est installé chez ces souris.

L'habitude ou l'habituation du vivant avec les déficits imposés par l'environnement n'est en fait qu'une loi de la nature qui exige l'adaptation pour assurer la survie de l'individu. Elle a été définie par Aristote comme une seconde nature, et suggérée par Lamarck comme la source des processus évolutifs qui assurent la transmission des caractères acquis par les parents à la descendance. Lorsqu'un nouvel événement apparaît dans l'environnement (stress) créant une rupture avec une habitude, l'organisme se mobilise pour restaurer l'état d'équilibre initial et pour intégrer cette nouvelle expérience dans répertoire d'expériences vécues afin de mieux y réagir au futur.

Le stress est l'interaction entre une force et la résistance de l'organisme à cette force, c'est le complexe agression-réaction. Cet ensemble de réactions, qui fut introduit et nommé par Selye [3] « syndrome général d'adaptation », correspond à l'aspect physiologique et endocrinien de la réaction de ce complexe d'agression-réaction.

Pour mieux appréhender ces réactions, de nombreux travaux se sont intéressés à l'étude des effets du stress prénatal à court terme sur le devenir du développement du fœtus tant dans des modèles animaux que chez l'homme [8, 9]. En effet, il a été rapporté que l'exposition prénatale à un stress provoque chez la progéniture des troubles neurophysiologiques [10], cognitifs et comportementaux [11] comme des troubles de la mémoire spatiale [12] jusqu'à l'apparition de l'anxiété et de la dépression [13, 14].

L'une des dernières hypothèses qui suggèrent une explication à ce phénomène de transmission, est que l'épigénétique représenterait l'interface via laquelle l'environnement agit pour modifier l'expression de nos gènes et du même coup, induire des changements comportementaux [15]. Ainsi, des événements majeurs traumatisants dans la vie tels que la perte d'un conjoint, la guerre, un conflit armé [16], ont été associés à l'installation de troubles de stress

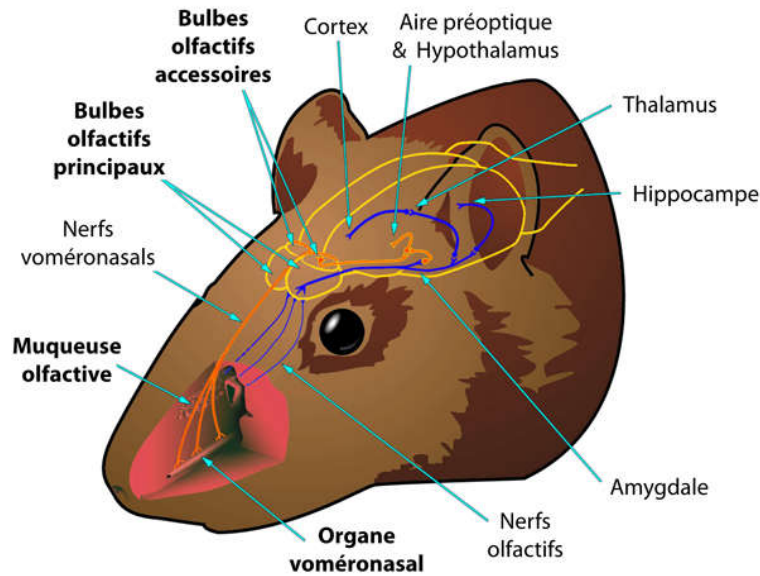
post-traumatique (PTSD) [17] et à une augmentation de l'incidence de la schizophrénie dans la progéniture de femmes enceintes à ce moment-là, en particulier celles au premier trimestre de leur grossesse [18].

Parallèlement à cela, plusieurs études ont conclu qu'un stress prénatal altère les performances de la mémoire, de l'apprentissage, de l'exploration allant jusqu'à l'apparition d'un état anxieux voire dépressif chez le rat [6, 14]. Cependant, Les résultats des études sur le stress prénatal chez l'animal sont parfois contradictoires, puisque Meek et son équipe [20] ont observé que des souris âgées de 12 jours, nées de mères stressées lors de la dernière semaine de gestation, ont montré une capacité exploratrice plus intense que celle du contrôle [21]. Une étude faite sur les singes a révélé qu'une forte exposition à un stress prénatal a entraîné une réduction de l'activité motrice et une faculté d'équilibration plus faible dans la progéniture [22]. Nazeri et *al.* [23] ont rapporté que l'équilibre et la fonction motrice étaient affectés uniquement chez les femelles juvéniles du Rat.

Outre la capacité d'équilibration, l'olfaction est un sens essentiel notamment pour déterminer la comestibilité de l'aliment ou pour détecter des dangers potentiels. Ce sens joue également un rôle prépondérant dans le comportement social de nombreuses espèces, tels que le choix du partenaire, les relations mère-petit ou la reconnaissance d'un groupe [24]. En guise d'exemple, le rat est un animal macrosmate, ce qui veut dire que l'olfaction est sa principale modalité sensorielle. Elle joue donc un grand rôle dans le contrôle de ses comportements sociaux tels que la recherche de nourriture ou de partenaire, la communication sociale, l'évitement de dangers [25]. Un rat peut par exemple apprendre qu'une nourriture n'est pas nocive s'il sent son odeur dans l'haleine d'un congénère qui n'a pas été malade après en avoir ingéré [26].

Le système olfactif du rat se compose de deux sous-systèmes distincts qui traitent en parallèle des informations chimiques différentes: les composés volatiles sont détectés par les neurorécepteurs de l'épithélium olfactif qui se projettent sur le système olfactif principal. En revanche, les composés odorants non volatiles, telles que les phéromones [27], sont détectées par l'organe voméronasal dont les neurones se projettent sur le système olfactif accessoire.

L'une des particularités anatomiques principales du système olfactif est que le bulbe olfactif se projette directement et sans relais thalamique sur de nombreuses structures limbiques et corticales tels que l'hippocampe et l'amygdale (**Figure 1**). L'ensemble de ces structures est connu sous le vocable cortex olfactifs primaires.



**Figure 1.** Organisation du système olfactif du rat

Le développement de cette fonction vitale durant la période de conception s'est révélé influençable par l'environnement émotionnel des femelles gestantes. Souza et *al.* (2012) ont rapporté dans leurs travaux que le stress de contention prénatal, appliqué durant la dernière semaine de la gestation, altère la reconnaissance de l'odeur du nid par les ratons stressés in utero (âges 7 jours) et ce même quand ces derniers ont été élevés par des femelles non stressées [28]. Cependant, aucune affection de la faculté olfactive par le stress prénatal n'a été détectée à l'issue des travaux de Wilson et coéquipiers [29].

A l'instar de l'olfaction et de l'équilibration, le comportement exploratoire est vu comme une composante importante du comportement social chez le Rat. En effet, Il est généralement associé à un acte moteur permettant la recherche de la nourriture ou d'un partenaire et la fuite devant un prédateur. Le comportement explorateur est associé également à des processus motivationnels et émotionnels [30]. L'exploration est définie en tant qu'un processus de reconnaissance environnementale qui mène à la construction d'une représentation neurale de ce dernier. Cette représentation comporte au moins deux éléments: Une représentation spatiale et la connaissance des stimuli qui y sont localisés [31]. Une perturbation de ce moyen d'apprentissage et d'acquisition cognitive peut compromettre la vie sociale de l'animal et restreindre ses liens sociaux.

Nous avons évalué ces fonctions dans le cas d'un stress multiple afin de vérifier l'hypothèse d'Evans [32] qui stipule que la réaction d'un organisme face à un stress multiple peut induire une

addition d'effets ou une multiplication positive (amplification) ou négative (atténuation). En effet, Evans postula pour l'existence de plusieurs modes de riposte comportementale et physiologique aux stressseurs environnementaux multiples. Suite à son étude portée sur des étudiants universitaires exposés à un stress mixte, Martimortuguès [33] a conclu que les facultés adaptatives sont significativement réduites chez ces étudiants, et les marqueurs de stress ont été perturbés d'avantage. Depuis lors, très peu d'études se sont intéressés aux effets multiplicatifs de plusieurs stressseurs et encore moins, à ces effets suite à une exposition prénatale.

De ce fait, plusieurs questions importantes surgissent :

- De quelle manière l'exposition à des événements qui surviennent au cours de la période conceptionnelle se répercuterait-elle sur le neurocomportement à l'adolescence (exploration, locomotion et anxiété) ?
- Les fonctions somatiques telles que le contrôle de la balance et l'olfaction, seront-elles également perturbées ?
- Comment les effets de ces stressseurs se conjuguent-ils ? Vont-ils être renforcés ou atténués ? Les stressseurs vont-ils réagir de manière synergique ou antagoniste ?
- La progéniture aura-t-elle une meilleure riposte adaptative vis-à-vis du stress prénatal ? Cette exposition répondra-t-elle à la définition d'un eustress, stress bénéfique et protecteur, ou alors à un distress, stress négatif qui entraîne une réaction inadaptée ?

Afin de répondre à ces questionnements, nous avons recherché l'impact sur les aspects fonctionnel et physiologique et comportemental que pourrait engendrer l'exposition prénatale à différents stimuli à savoir ; stress sonore et stress de contention ainsi qu'un stress mixte combinant les deux. Pour cela, le stress sonore a été choisi comme paradigme de stress dans notre étude afin de simuler et reproduire l'exposition naturelle de l'humain à un bruit ambiant élevé (klaxons de véhicules, bruit des avions...etc.). Le stress de contention, quant à lui, a été adopté comme modèle de stress prénatal en raison de son efficacité dans l'induction des altérations neurobiologiques et comportementales postnatales rapportée dans les différents rapports [34].

Par extrapolation de l'hypothèse d'Evans qui stipule l'existence de plusieurs modes de riposte à un stimulus stressant par un organisme, nous avons émis l'hypothèse de l'existence de

plusieurs modes selon lesquels un stress prénatal multiple pourrait influencer le comportement et la physiologie de la descendance à l'adolescence. Etant donné que le neurodéveloppement durant le stade embryonnaire est influencé par l'état émotionnel de la mère, nous suggérons que les éventuels troubles observés chez la progéniture seraient proportionnels à l'intensité du stimulus appliqué.

La présente thèse étant axée sur les effets du stress prénatal, notre objectif principal vise l'étude de la nature d'interaction entre différents stressseurs (amplification ou atténuation) en traçant des objectifs contributifs pour explorer plusieurs facettes neurophysiologiques :

- endocrine par le dosage de l'ACTH et le poids des glandes surrénales qui reflètent l'activité de l'axe HPA ;
- hépatique : car carrefour des principales voies métaboliques ;
- immunologique périphérique et centrale : du fait de l'étroite relation entre système nerveux centrale et système immunitaire.

Parmi les aspects fonctionnels étudiés, nous nous sommes penchés sur le maintien de l'équilibre du corps, ou capacité d'équilibration. En effet, le contrôle de l'équilibre semble avoir reçu très peu d'attention dans le domaine du stress, bien que l'exposition au stress prénatal puisse probablement influencer de manière significative le contrôle d'équilibre de la progéniture. Aussi, il est à noter que l'effet de l'exposition à un stress mixte ou multiple pendant la vie intra-utérine sur le contrôle de l'équilibre n'a jamais été étudié.

Nous avons également tenté d'apporter un plus dans la compréhension des effets d'une exposition prénatale à un stress multiple sur des fonctions majeures dans la survie de l'individu que sont les performances motrices et ce en essayant de mettre en évidence la part du système immunitaire périphérique et central dans l'apparition de tels troubles chez le Rat albinos.

En outre, nous avons ciblé la fonction olfactive et les éventuelles altérations pouvant la perturber, et ceci pour estimer l'impact de l'environnement prénatal sur les éventuelles altérations fonctionnelles chez la progéniture adolescente.

Pour ce faire, nous avons utilisé le Rat Wistar, le modèle animal plus dans les études expérimentales, en l'occurrence neurobiologiques. Nous avons employé deux paradigmes de stress largement utilisés dans le domaine de neuroscience, il s'agit du stress sonore et du stress

de contention et dont la combinaison a été utilisée comme modèle de stress mixte ou multiple. Ce dernier étant une combinaison originale dans l'étude du stress prénatal a été validée au préalable par le dosage de l'ACTH chez des males adultes suite à une application directe de ce paradigme.

Globalement, l'objectif de la présente étude est de tester l'hypothèse de la transmissibilité verticale des effets psychosomatiques de stress et mettre en évidence le mode du *coping* (adaptation) exprimé par la descendance, et déterminer dans quelle mesure le stress sonore et le stress de contention, d'abord appliqués individuellement, puis combinés, affectent le neurodéveloppement de la descendance.

# **MATERIEL & METHODES**

Notre travail de recherche qui entre dans le cadre de la réalisation de ma thèse de doctorat a été mené dans les structures suivantes :

- Bloc d'animalerie annexe au département de biologie, faculté des sciences, UBMA
- Laboratoire de Biochimie et de microbiologie appliquée à la santé et à l'agroalimentaire, UBMA, Algérie,
- Laboratoire de biochimie, centre hospitalo-universitaire Ibn Rochd, Annaba, Algérie,
- Laboratoire de pathogénèse et de vaccination lentivirales, Université Joseph Fourier, Grenoble, France,
- Institut de neuroscience de Grenoble (GIN), université Joseph Fourier, Grenoble, France.

Les présents travaux ont été réalisés durant la période allant de Mars 2014 jusqu'à Octobre 2015.

## **1. Modèle animal et élevage**

24 femelles adultes de Rats Albinos provenant de l'Institut Pasteur ont fait l'objet de notre étude. Après réception, les rats ont été mis 10 jours au repos au niveau de l'animalerie pour une période d'adaptation. Ensuite ils ont été répartis en groupe de quatre par cage. La température et l'hygrométrie ont été maintenues respectivement à  $25 \pm 2$  C° et 50%. La photopériodicité spécifique à l'espèce du Rat Wistar (12H/12H) a été respectée. Après la période d'acclimatation, le protocole expérimental a démarré avec un poids moyen des rats mâles de  $200 \pm 20$ g. L'accès à l'eau et l'alimentation standard fournie par l'Office National d'Alimentation de Bétail (ONAB, Al Kseur-Bejaia, Algérie) était *ad libitum*. Un pré test a été effectué sur des mâles adultes par application directe de nos modèles de stress dans le but de les valider.

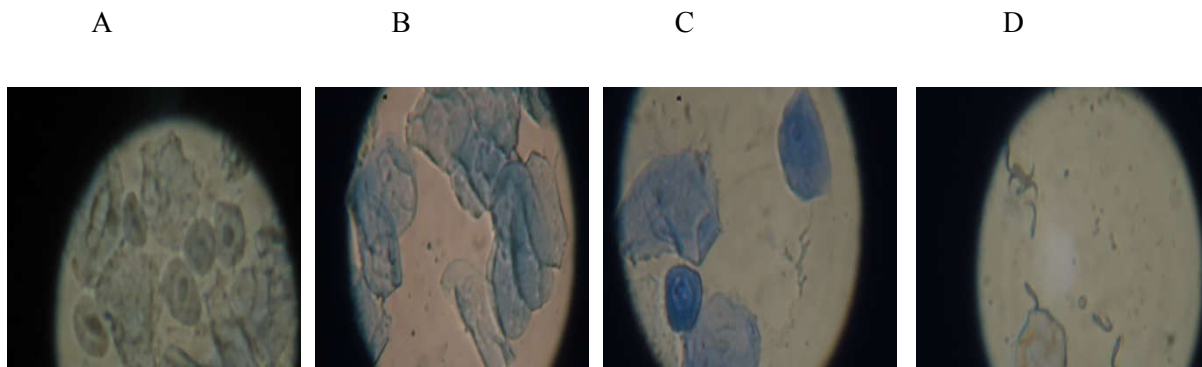
### **1.1. Mise en gestation et stress prénatal**

Afin de stimuler et synchroniser le cycle œstral chez les femelles [35], des cages contenant 2 mâles ont été posées à côté de celle des femelles. Après 7 jours d'exposition aux phéromones masculines, les femelles ont été placées deux à deux avec un mâle pour accouplement.

Le jour  $J_0$  de la gestation correspond au jour où la présence de spermatozoïdes a été vérifiée par frottis vaginal (Figure 1). Les femelles gestantes ont été réparties en 4 groupes expérimentaux de 6 rats et placées 3 par cage à savoir :

- Groupe témoin (T),
- groupe stress sonore (SS),
- groupe stress de contention (SC)
- groupe stress mixte (SM).

La litière des cages a été changée régulièrement tous les 4 jours.



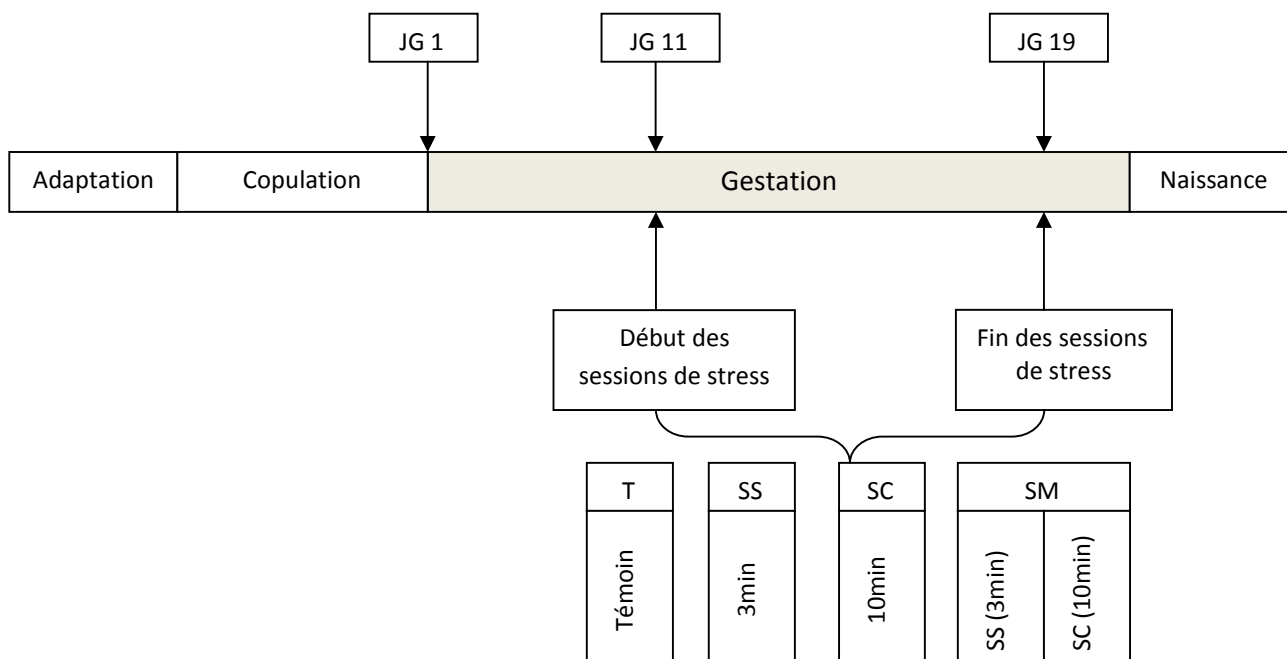
**Figure 2** : Observation microscopique des stades œstraux de la rate Wistar Albinos. A : Proestrus cellule épithéliales nucléées et cellules épithéliales cornifiées ; B : Œstrus, présence de cellules épithéliales; C : Metoestrus, cellules épithéliales cornifiées et leucocytes ; D : Acceptation et fécondation, présence de spermatozoïdes. (Motic B2 Series, Sony Karl Zeiss 14MP) (Photo prise par S.BADACHE, 2015).

## 1.2. Traitement des femelles gestantes

A partir de J11 de la gestation jusqu'au J19, les groupes de stress ont été exposés quotidiennement entre 08:00 et 10:00 à des sessions de stress ; stress sonore, stress de contention et dans le troisième groupe un stress sonore suivi d'un stress de contention après une pause de 10mn. Le choix de cette période d'exposition au stress s'explique par le stade de neurogénèse chez le foetus du Rat qui commence à exprimer les récepteurs aux glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes à partir de J13 [36, 37]. Les rates des groupes de stress ont été exposées à ces modèles de stress :

- Les rates (SS) exposées au stress sonore pendant 3 mn,
- Les rates (SC) exposées au stress de contention pendant 10 mn
- Les rates (SM) exposées d'abord au stress sonore pendant 3 min puis au stress de contention pendant 10 min avec un intervalle de temps de 10 min entre les deux épreuves de stress.

Le protocole général des expérimentations réalisées dans cette partie du travail est illustré dans la **figure 3**.



**Figure 3.** Schéma illustrant le protocole expérimental. JG : jour gestationnel, T : témoin ; n=6, SS : stress sonore ; n=6, SC : stress de contention ; n=6, SM : stress mixte ; n=6

### 1.2.1. Stress sonore

Le système confectionné en vue de l'application d'un stress sonore sur les rats, se compose d'un box (20cm x 30cm x 20cm) en verre épais (7mm) pour éviter la déperdition d'intensité sonore et assurer une bonne isolation. La face supérieure de ce box est munie d'une ouverture carrée (10 cm x 10 cm) pour faire entrer l'animal à l'intérieur de l'enceinte.

A l'intérieur du box en verre, un klaxon du modèle HELLA Twinetone Horn, Japan (110dB 500Hz, 12V) est fixé sur une plaque de polystyrène maintenue à la verticale. Le klaxon est connecté à un adaptateur de type Anlixun (12V, 5A) pour assurer une alimentation sur courant alternatif. Le dispositif est illustré dans la **figure 4**. L'épreuve de stress sonore consiste à placer l'animal dans le dispositif en verre, fermer l'ouverture avec son couvercle en verre et démarrer le klaxon pendant 3 minutes. Après les trois minutes de stress, l'animal passe à la phase de repos de 10 minutes avant d'entamer l'étude du comportement des femelles gestantes.



**Figure 4.** Dispositif du stress sonore

### 1.2.2. Stress de contention

Les rats ont été placés individuellement dans un système de contention inspiré du modèle de Bardin et *al.*[38]. Le système consiste en une boîte cylindrique (14.5 cm x 5.5 cm) en forme de bouteille, dont la base est coupée pour faire entrer l'animal à l'intérieur. L'autre bout est muni d'une ouverture qui fait office d'une bouche d'aération d'un diamètre de 1 cm (**Figure 5**). Ce type de stress consiste à introduire l'animal à l'intérieur du système de contention et le maintenir immobile sans accès à l'eau et à l'alimentation. Le stress de contention a été utilisé comme modèle de stress psychologique [39], [40] car le Rat est un animal qui vit au sein d'une groupe et le fait de l'isoler de ses congénères représente une menace et génère un comportement anxieux [41].



**Figure 5.** Système de contention

### 1.2.3. Stress Mixte

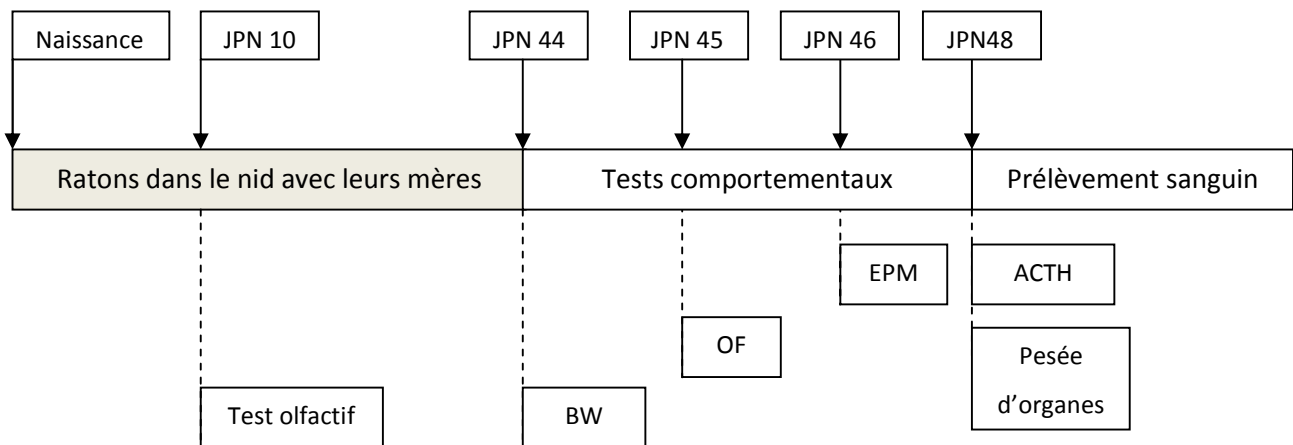
Il s'agit là d'exposer les femelles gestantes dans un premier temps au stress sonore puis au stress de contention en respectant les mêmes durées précédemment citées, avec un intervalle de repos de 10 minutes entre les deux épreuves de stress.

### 1.3. Traitement de la progéniture

Après 72 heures de la mise bas, tout les ratons ont été sexés et pesés et remis dans leur cages où ils étaient maintenus dans des conditions standards d'élevage décrites plus haut tout en évitant toute manipulation inutile. Par ailleurs, et en vue d'une exploration de l'état émotionnel et locomoteur, nous avons eu recours à une série de tests comportementaux qui ont été effectués à partir du jour post-natal 44 (JPN 44). Après sevrage et à JPN 44, uniquement les mâles ont été retenus pour la suite de l'étude. Des groupes de 16 mâles de chaque lot de stress ont été sélectionnés aléatoirement en vue d'une étude comportementale qui vise à l'évaluation de :

- Performances olfactives (test olfactif),
- Degré d'anxiété (EPM),
- Locomotion et exploration (OF),
- Capacité d'équilibration (BW).

Les tests de comportement ont été effectués selon l'ordre suivant : à JPN 10 : test olfactif, à JPN 44 : BW, à JPN 45 : OF et EPM à JPN 46. Du fait de l'effet anxiogène de l'OF et EPM, ces deux tests ont été performés après le BW qui est un test très sensible à l'état émotionnel de l'animal. Un suivi du poids corporel des ratons a été réalisé jusqu'à JPN 30 en utilisant une balance de type OHAUS SC SERIES. Tous les tests de comportement ont été réalisés entre 08 :00 et 12 :00 AM dans un box différent de celui réservé à l'élevage. Une heure avant les épreuves de test, les animaux ont été transférés dans la pièce où se trouvent les dispositifs réservés à cet effet. Les tests comportementaux utilisés dans cette partie d'étude sont décrits dans la section suivante. Le protocole du traitement de la progéniture est schématisé dans la **Figure 6**.



**Figure 6.** Schéma illustrant le protocole de traitement de la progéniture. JPN : Jour post-natal, BW : Beam walking (test du mâât arrêté), OF: Open field (test du champ ouvert), EPM: Elevated plus maze (test de la croix surélevée), ACTH : Hormone adénocorticotrope. Le protocole illustré supra a été respecté dans les 4 groupes de rats à savoir : Témoin (N=16), Stress sonore (N= 16), Stress de contention (N=16), Stress mixte (N=16).

### 1.3.1. Etude comportementale

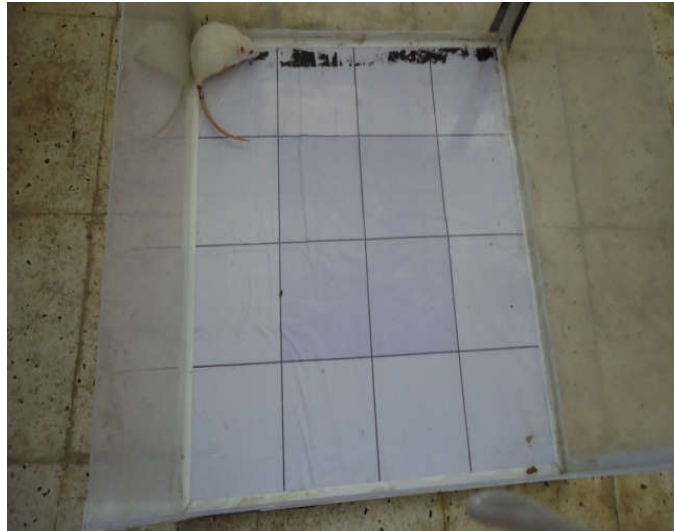
#### 1.3.1.1. Test du champ ouvert (*Open field test*)

Ce test, inspiré du modèle de Hall et *al.* [42], a été conçu afin d'évaluer la réaction d'un animal vis-à-vis d'un environnement nouveau et spacieux. Il permet l'observation du comportement moteur explorateur de petits rongeurs dans une situation potentiellement génératrice de stress.

Il s'agit d'un dispositif composé d'un plancher carré de forme, mesurant 100 cm de chaque côté et divisé en 16 cases de dimensions égales (4cm x 4 cm) ; 12 cases périphériques et 4 au centre. La base est protégée par une paroi verticale transparente en plexiglas de 30 cm de hauteur (**Figure 7**). Ce test est utilisé afin de mettre en contraste le niveau d'activité motrice (distance parcourue) et évaluer également la tendance de l'animal à l'exploration horizontale (Distance parcourue et temps passé au centre) et verticale (Temps de redressement). Pour ce faire, l'animal est posé soigneusement, au centre du dispositif et son comportement est enregistré pendant 5 minutes (Sony Karl Zeiss 14.1mp). Lors du dépouillement des vidéos, plusieurs paramètres ont été notés :

- Temps passé dans les coins (temps de latence),
- Temps passé au centre,
- Temps de redressement,

- Distance parcourue.

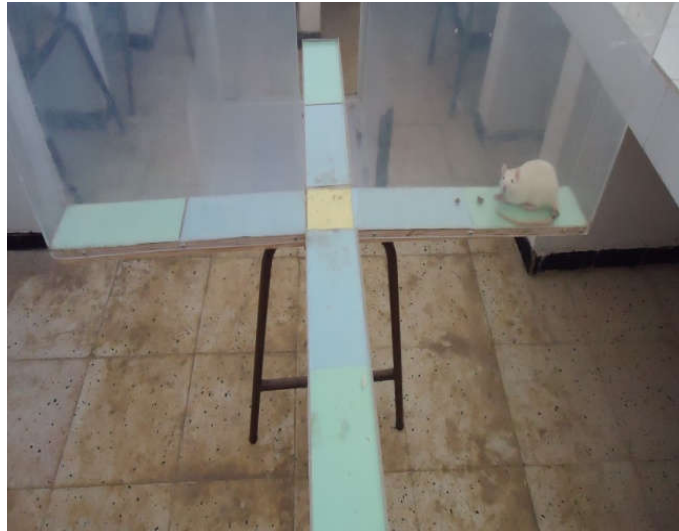


**Figure 7.** Test du champ ouvert (*Open field*)

A la base, le test du champ ouvert est conçu pour évaluer l'état émotionnel et l'anxiété des rongeurs : un animal émotif s'immobilise souvent dans les coins (comportement de *freezing*) et limite ses déplacements dans la périphérie. Par contre, un animal « flegmatique », son comportement est caractérisé par de nombreux déplacements aussi bien à la périphérie qu'au centre du champs et par le nombre de redressements [43].

### **1.3.1.2. Test du labyrinthe en croix surélevée (*Elevated plus maze*)**

Ce paradigme a été conçu par Montgomery [44] consiste en un labyrinthe en forme de croix, qui possède deux corridors fermés et deux ouverts (sans murs). Ses bras mesurent 50 cm de longueur et 10 cm de largeur. Les deux bras fermés sont protégés par une paroi en plexiglas de 40 cm de hauteur. Les deux autres bras (perpendiculaires aux deux autres) étant dépourvus de paroi protectrice, sont nommés : Bras Ouverts (BO). La croix est surélevée du sol de 50 cm de hauteur (**Figure 8**). Le test crée un conflit approche-évitement entre l'envie naturelle d'exploration du rongeur et sa peur des espaces ouverts (qui le met à la vue des prédateurs).



**Figure 8.** Test de la croix surélevée (*Elevated plus maze*)

Dans ce test, le rat est posé au centre du labyrinthe (intersection des quatre bras), la tête orientée vers l'un des bras ouverts, Le rat est filmé pendant 5 minutes et son comportement est étudié ultérieurement où les paramètres suivants sont comptabilisés :

- Temps passé dans les bras ouverts
- Temps passé dans les bras fermés
- Temps de redressement

Un phénotype anxieux se caractérise par une diminution du temps passé dans les bras ouverts par rapport au temps passe dans les bras fermés [45].

### **1.3.1.3. Test Olfactif (Reconnaissance du nid)**

Le test de la reconnaissance du nid a été adapté par Reineki et al. [46] dans le but de tester les performances olfactives chez le rat, basé sur la discrimination des odeurs et la reconnaissance de l'odeur du nid. Il vise à tester l'orientation de l'animal vis-à-vis de l'environnement familier. L'épreuve du test consiste à placer individuellement un raton âgé de 10 jours dans une enceinte rectangulaire en PVC (40x25x15cm) à une distance de 20cm de deux amas de sciures (sciure propre et sciure du nid) posés dans deux coins adjacents de la cage. Les deux amas de sciure sont séparé par une zone neutre de 2 cm qui s'étend jusqu'à l'autre côté de la cage. Le raton est placé dans cette zone neutre en face de la sciure. L'animal doit choisir entre la sciure du nid imprégnée d'urines et de fèces maternelles et la sciure propre qui ne contient aucune trace de la mère ou de la colonie.

Les paramètres retenus dans ce test sont le sens d'orientation de l'animal (sciure du nid, sciure propre) et le temps de latence. Chaque rat a subi 3 tests d'entraînement avant le test proprement dit afin de le familiariser avec le dispositif. Le comportement de chaque rat a été enregistré par une caméra Sony Karl Zeiss 14.1 MP, puis étudié ultérieurement. Après chaque test, la cage a été nettoyée avec de l'éthanol à 90% pour éliminer toute trace d'odeur.

#### 1.3.1.4. Test du mât arrêté (*Beam walking test*)

Inspiré du modèle de Piza [47], ce test évalue la coordination motrice et la capacité de l'animal à maintenir son équilibre en marchant sur une barre étroite et élevée. Ce test est utilisé pour quantifier le déficit moteur lié aux dommages du système nerveux, manipulations génétiques ou effets pharmacologiques [48].

Le dispositif se compose d'une barre de 100 cm de longueur et de 3 cm de section de chaque côté, fixée horizontalement sur deux supports verticaux en bois de chaque côté de chaque. La barre est placée à 50 cm au dessus du sol (**Figure 9**). L'épreuve du test consiste à poser l'animal sur l'extrémité du mât et comptabiliser le temps qu'il met pour avancer sur sa longueur et le nombre de faux-pas qu'il fait. Pour faciliter l'estimation de la distance parcourue, des graduations sont marquées chaque 10 cm.



**Figure 9.** Dispositif du mât arrêté : test de l'équilibre en condition dynamique

Cette épreuve évalue la capacité d'équilibre postural et la coordination motrice du rat en mouvement. Les paramètres notés sont le temps mis par l'animal pour traverser le mât ainsi que le nombre de faux-pas.

### 1.3.2. Prélèvement sanguin et dosages plasmatiques

A JPN 48, le prélèvement sanguin a été réalisé par ponction rétro orbitaire (**Figure 10**) après les 48h qui ont suivi les tests de comportement. Le sang a été récupéré à partir de la veine sinusale en introduisant un capillaire d'hématocrite (0.5mm) dans le plexus retro orbitaire [49] après avoir vérifié que le rat est profondément anesthésié par du chloroforme. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinés pour le dosage de l'ACTH et des paramètres biochimiques, et dans des tubes EDTA pour l'établissement de la formule numérique sanguine.



**Figure 10.** Technique de prélèvement rétroorbitaire

#### 1.3.2.1. Dosage de l'hormone adénocorticotrope ACTH

La technique de dosage est immunologique visant la détermination quantitative in vitro de l'hormone corticotrope ACTH par la méthode « Sandwich ». Le dosage de l'ACTH se réalise par électrochimiluminescence à l'aide de l'automate « ECLIA » et COBAS e 411. Le principe de cette technique est résumé dans les étapes infra :

- 1<sup>ère</sup> incubation : un volume de 50µl de plasma est mis en contact avec un anticorps primaire monoclonal anti ACTH biotinylé, et après un temps d'incubation, un anticorps secondaire conjugué à la Ruthénium sera rajouté dans le milieu. Un complexe dit « Sandwich » se forme.
- 2<sup>ème</sup> incubation : les microparticules couplées à la streptavidine sont rajoutées dans les puits contenant le plasma et un complexe immunologique est fixé à la phase solide des puits par une liaison Streptavidine-biotine. Le tout est lavé afin d'éliminer les Ac

secondaires non liés. après cela, les complexes restant sont transférés dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. La différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence par le ruthénium qui est mesurée par un photomultiplicateur. Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration générée par l'analyseur.

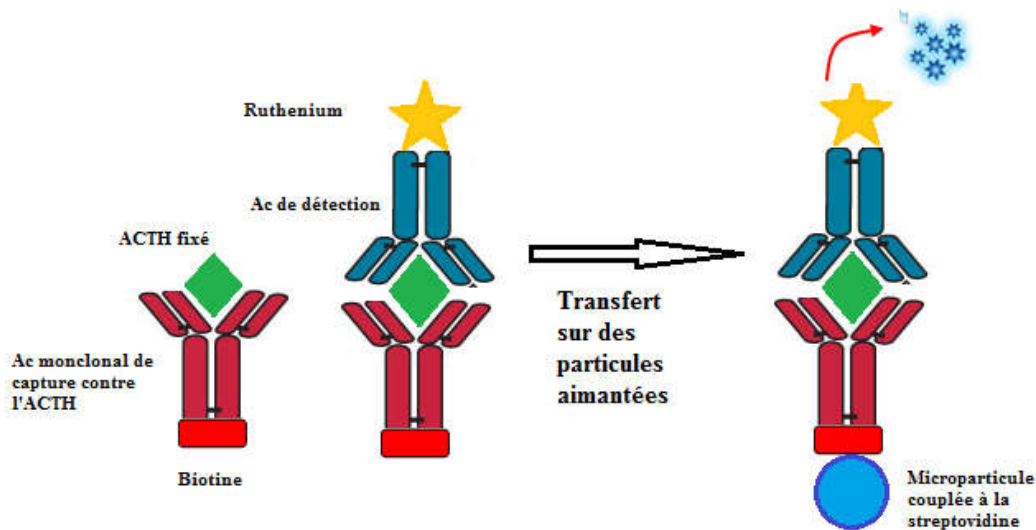


Figure 11. Principe ELISA en sandwich [50]

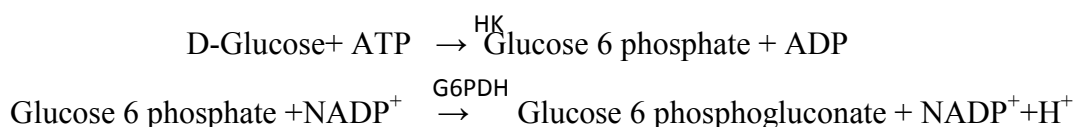
### 1.3.2.2. Dosage des paramètres biochimiques

#### 1.3.2.2.1. Glycémie

Le dosage du taux plasmatique de glucose a été réalisé selon la méthode enzymatique à l'hexokinase (HK) sur un analyseur de type COBAS INTEGRA 400. Les réactifs utilisés sont contenus dans des cassettes spécifiques de type COBAS INTEGRA HK GLUC2 destinées à la détermination du glucose dans le sérum, le plasma, les urines et le liquide céphalorachidien (LCR).

- **Principe**

La HK catalyse la phosphorylation du glucose par l'ATP pour former le glucose 6 phosphate (G6P) et de l'ADP. Ensuite, une seconde enzyme : la G6p déshydrogénase (G6PDH) catalyse l'oxydation de G6P par le  $\text{NADP}^+$  pour former le NADPH.



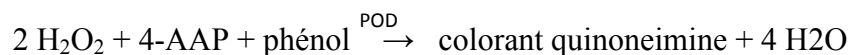
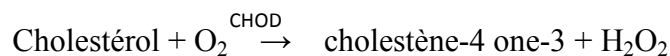
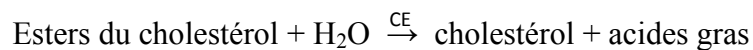
La concentration de NADPH est directement proportionnelle à la concentration de glucose. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 340nm.

#### 1.3.2.2.2. Cholestérolémie

Comme pour le glucose, la cassette COBAS INTEGRA Cholestérol (CHOLL) contient des réactifs de diagnostic in vitro destinés à la détermination quantitative du cholestérol total dans le sérum et le plasma sur les analyseurs COBAS INTEGRA 400. Le dosage suit une méthode enzymatique/ colorimétrique dite (CHOD/PAP) utilisant la cholestérol-estérase, la cholestérol-oxydase et la 4 aminoantipyrine.

- **Principe**

La cholestérol-estérase (CE) hydrolyse les esters du cholestérol pour former du cholestérol libre et des acides gras. La cholestérol-oxydase (CHOD) catalyse ensuite l'oxydation du cholestérol en cholestène-4 one-3 et en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé entraîne le couplage oxydatif du phénol et de la 4-amino-antipyrine (4-AAP) pour former un colorant quinoneimine rouge.



L'intensité de la couleur du colorant quinoniémine est directement proportionnelle à la concentration du cholestérol. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 520nm.

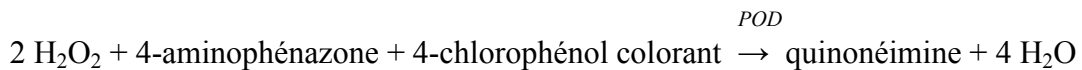
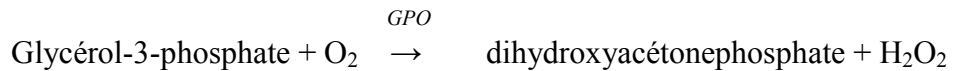
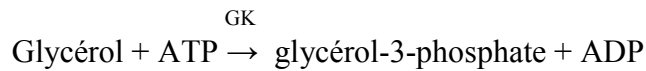
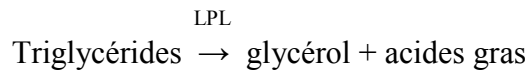
#### 1.3.2.2.3. Triglycéridémie

Les triglycérides incorporés dans les lipoprotéines représentent les principaux lipides présents au niveau plasmatique. La méthode utilisée ici pour leur dosage plasmatique est enzymatique/colorimétrique utilisant la glycérol-phosphate-oxydase et la 4-aminophénazone. La détermination qualitative de leur taux plasmatique a requis l'utilisation de cassettes COBAS INTEGRA Triglycérides (TRIGL) sur l'analyseur COBAS INTEGRA 400.

- **Principes :**

Les triglycérides sont hydrolysés par la lipoprotéine-lipase (LPL) en glycérol et acides gras. Le glycérol est alors phosphorylé en glycérol-3-phosphate par l'ATP lors d'une réaction catalysée par la glycérolkinase (GK). L'oxydation du glycérol-3-phosphate est catalysée par la glycérol-phosphate-oxydase (GPO) pour former du dihydroxyacétone-phosphate et du peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). En présence de peroxydase (POD), le peroxyde d'hydrogène formé

entraîne le couplage oxydatif du 4-chlorophénol et de la 4-aminophénazone pour former un colorant quinoneimine rouge, qui est mesuré à 512 nm.



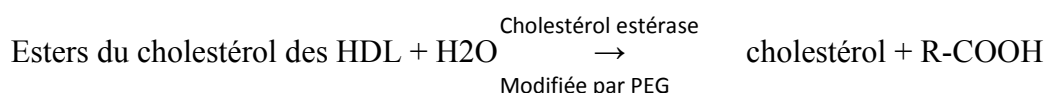
L'augmentation d'absorbance est directement proportionnelle à la concentration de la quinonéimine elle-même proportionnelle aux triglycérides dans l'échantillon.

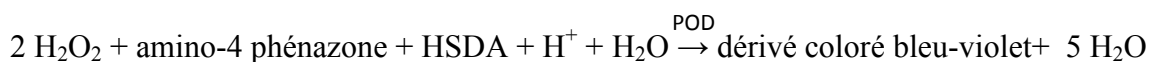
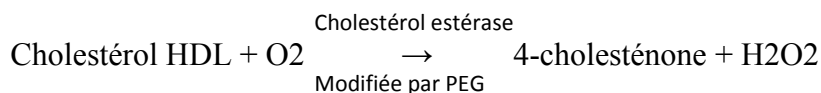
#### 1.3.2.2.4. HDL-Cholestérolémie

Le dosage plasmatique des *High Density Lipoprotein-cholesterol* (HDL-C) consiste en un test colorimétrique en phase homogène sur l'analyseur COBAS INTEGRA 400, en utilisant des cassettes COBAS INTEGRAS HDL-Cholesterol plus 2<sup>nd</sup> generation (HDL-C).

- **Principe**

En présence de sulfate de magnésium, le sulfate de dextran forme de manière sélective des complexes hydrosolubles avec les *low density lipoprotein cholesterol* (LDL), les *very low density lipoprotein* (VLDL) et les chylomicrons; ces complexes sont résistants vis-à-vis d'enzymes modifiées par le polyéthylène glycol (PEG). La concentration en cholestérol des HDL est déterminée par voie enzymatique à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase modifiées par du PEG (Environ 40% des groupes aminés de ces enzymes sont couplés à du PEG). Sous l'action de la cholestérol-estérase modifiée par le PEG, les esters du cholestérol des HDL sont scindés en cholestérol et acides gras. Dans une réaction ultérieure catalysée par la cholestérol-oxydase modifiée par le PEG le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en 4-cholesténone avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase l'eau oxygénée formée réagit avec l' amino-4 phénazone et le N-(hydroxy-2 sulfo-3 propyl) diméthoxy-3,5 aniline (HSDA) avec formation d'un dérivé coloré.





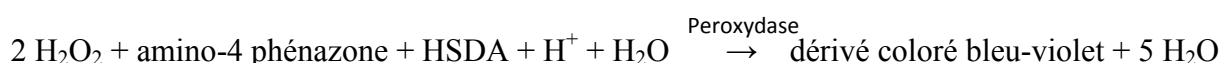
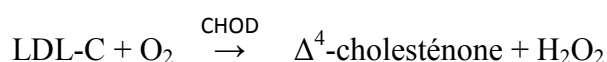
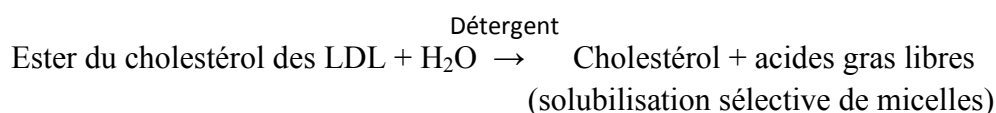
L'intensité de la couleur du colorant quinoneimine bleu-violet est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol HDL. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 583 nm.

### 1.3.2.2.5. LDL-Cholestérolémie

Ce dosage fait appel à une technique enzymatique/colorimétrique dont les réactifs sont contenus dans des cassettes COBAS INTEGRA LDL-cholesterol plus 2 nd generation (LDL-C). La technique est automatisé sur l'analyseur CONAS INTEGRA 400.

- **Principe :**

La méthode directe de dosage du cholestérol LDL décrite ici fait appel à la solubilisation micellaire sélective du cholestérol LDL à l'aide d'un détergent non ionique et à l'interaction d'un dérivé glucidique et de lipoprotéines (VLDL et chylomicrons). Si l'on intègre un détergent dans le dosage enzymatique du cholestérol effectué à l'aide de cholestérol-estérase et de cholestérol-oxydase, le cholestérol des différentes fractions lipoprotéiques présente une réactivité croissante dans l'ordre suivant: HDL < chylomicrons < VLDL < LDL. En présence de  $\text{Mg}^{++}$  la réaction enzymatique du cholestérol des VLDL et des chylomicrons est considérablement diminuée par un dérivé glucidique. L'utilisation conjointe d'un dérivé glucidique et d'un détergent rend possible le dosage sélectif du cholestérol LDL dans le sérum. Sous l'action de la cholestérol-estérase les esters du cholestérol des LDL sont scindés en cholestérol et acides gras. Dans une réaction ultérieure catalysée par la cholestérol-oxydase le cholestérol est transformé, en présence d'oxygène, en 4-cholesténone avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase l'eau oxygénée formée réagit avec l'amino-4 phénazone et l'HSDA avec formation d'un dérivé coloré.



L'intensité de la couleur du colorant quinoneimine bleu-violet est directement proportionnelle à la concentration de cholestérol LDL. On la mesure avec l'augmentation de l'absorbance à 583 nm.

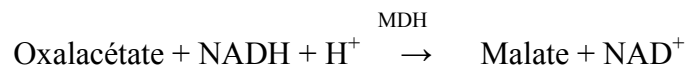
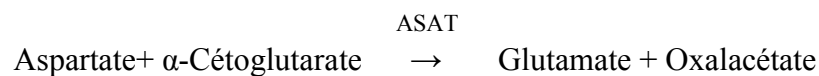
#### 1.3.2.2.6. Taux des transaminases ASAT et ALAT

Les deux enzymes aspartate amino transférase ou ASAT et alanine amino transférase ou ALAT ont été dosées manuellement sur du plasma. Une méthode enzymatique a été utilisée telle que décrite dans la fiche de méthode du fournisseur SPINREACT® Espagne. La lecture de l'absorbance a été effectuée sur un spectrophotomètre SECOMAM UVLine 9400.

- **Principe**

- a. **ASAT**

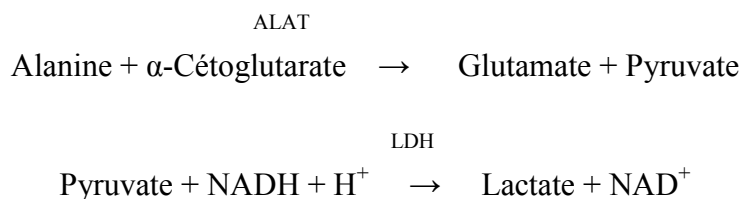
L'aspartate amino transférase (ASAT), initialement appelée transaminase glutamate oxaloacétique (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine de l'aspartate vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et d'oxalacétate. L'oxalacétate produit est réduit en malate en présence de déshydrogénées (MDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH, déterminée photo numériquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ASAT dans l'échantillon. La lecture se fait à la longueur d'onde de 340 nm.

- b. **ALAT**

L'alanine amino transférase (ALT) initialement appelée transaminase glutamique pyruvique (GPT) catalyse le transfert réversible d'un groupe amine d'alanine vers l'alpha-cétoglutarate à formation de glutamate et de pyruvate. Le pyruvate produit est réduit en lactate en présence de lactate déshydrogénase (LDH) et NADH:



La vitesse de réduction de la concentration en NADH, déterminée photométriquement, est proportionnelle à la concentration catalytique d'ALAT dans l'échantillon. La lecture se fait à 340 nm.

### 1.3.2.3. Formule leucocytaire sanguine

Le comptage des cellules circulantes dans le sang, en l'occurrence cellules immunitaires, a été réalisé sur du sang recueilli sur tubes EDTA. La numération s'est faite sur un analyseur automatique : Sysmex XT 2000i, disponible au niveau d'un laboratoire privé d'analyses médicales à Annaba. La technique employée en vue de l'analyse qualitative et quantitative des cellules sanguine est la fluoro-cytométrie en flux.

- **Principe**

Dans la fluoro-cytométrie en flux, chaque cellule sanguine colorée par des fluorochromomes est éclairée par un faisceau laser semi-conducteur, ce qui permet une analyse sophistiquée basée sur la teneur en ARN/ADN de toute la cellule (noyau et cytoplasme), la taille de la cellule, le contenu de la cellule et la texture de la surface cellulaire. En regardant à l'intérieur de la cellule et en jugeant les activités physiologiques liées à la réplication de l'ADN et de la synthèse protéique, il devient possible de déterminer facilement le type de cellule et sa phase de maturation. La collecte et le traitement rapide de trois signaux optiques obtenus à partir de chaque cellule sont la base de l'identification cellulaire. Le signal de la diffusion avant (taille de la cellule), le signal de la diffusion latérale (teneur en ARN/ADN) de chaque cellule sont analysés lorsqu'ils passent à travers la cellule de flux. La combinaison de ces signaux décrit une image concise et précise de chaque cellule sanguine périphérique détectée.

### 1.3.3. Prélèvement d'organes

A JPN48 et après la réalisation de tous les tests comportementaux, ont été euthanasiés, disséqués et leurs cerveaux, foies et surrénales ont été extraits. L'euthanasie a été effectuée par inhalation de chloroforme sous une cloche en verre. Chaque rat a été ensuite posé sur une plaque de polystyrène en décubitus dorsal et fixé par ses pattes pour faciliter la manipulation. Le foie et

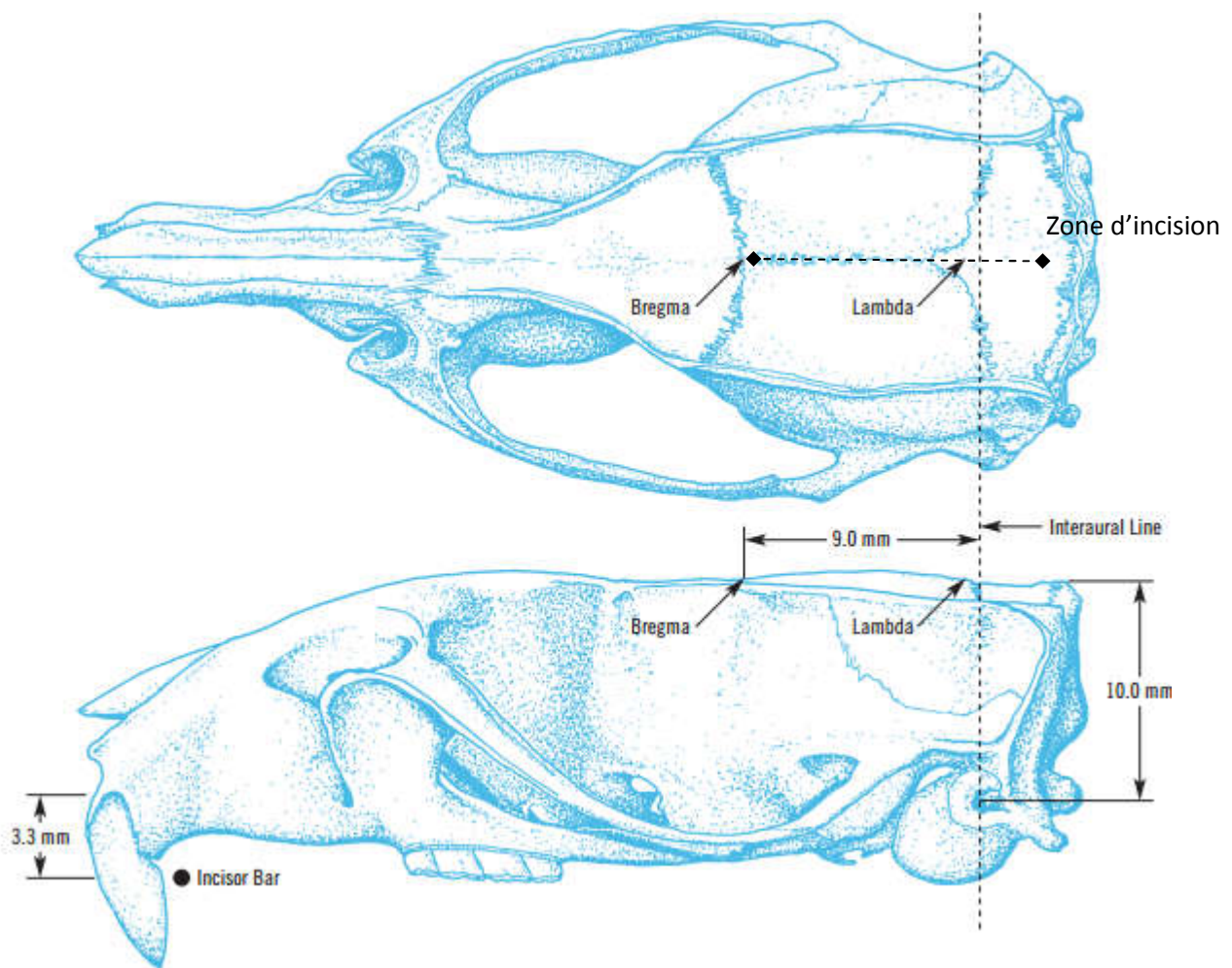
les surrénales ont été prélevés après avoir réalisé une ouverture longitudinale allant de l'orifice urogénital jusqu'à manubrium sternal, de la cavité abdominale.

Les organes prélevés ont été rincés, pesés et conservés dans le formol pour une étude histologique. Le poids relatif des organes est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Poids relatif} = \text{poids absolu des glandes surrénales} / \text{poids absolu du rat [51]}.$$

#### **1.3.3.1.. Extraction du cerveau et conservation par Snapfreez**

À J 49 post partum, et afin de procéder au prélèvement du cerveau, 3 Rats de chaque groupe ont été choisis aléatoirement pour l'extraction du cerveau en vue d'une immunohistochimie. Une anesthésie générale a été effectuée sur chaque rat par inhalation de chloroforme. Le rat est introduit dans une boîte hermétique en présence d'un bout de coton imbibé au chloroforme. Une fois l'anesthésie générale vérifiée (rythme respiratoire et pool cardiaque ralenti), le rat est retiré de sous la cloche. Le cerveau est immédiatement extrait de la boîte crânienne après ouverture de la calotte osseuse par incision de l'os pariétale, en allant jusqu'au Bregma, point reliant la suture coronale à la suture sagittale (**Figure 12**).



**Figure 12.** Structure du crâne du rat et point d'incisions en vue de l'extraction du cerveau, désignés par des pointillés entre Lambda et Bregma Tiré de *"The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition"*, George PAXINOS et Charles WATSON [52]

Le cerveau est posé délicatement sur le fond d'une boîte de Pétri stérilisée, placée sur un tapis de carboglace. Les deux hémisphères sont ensuite séparés à l'aide d'une lame fine qui a servi aussi à la confection des coupes coronales de 3 mm d'épaisseur. Les 8 coupes du cerveau (4 de chaque hémisphère) ont été recueillies dans des Eppendorf stérilisés et étiquetés. Ses derniers ont été ensuite remplis graduellement jusqu'au maximum de leur capacité avec un milieu de conservation (Diméthylsulfoxyde (DMSO) 10% + sérum fœtal du veau (FBS) 90%) tout en assurant une agitation manuelle et refroidissement immédiat, puis plongés dans un bac de carboglace (**Figure 13**). Ensuite, les échantillons ont été plongés dans de l'azote liquide puis conservé à  $-80^{\circ}\text{C}$  au niveau du laboratoire de biochimie, CHU Ibn Rochd, Annaba.



**Figure 13.** Snapfreezing des échantillons et conservation pour une IHC. A : Extraction du cerveau de la boîte crânienne, B : séparation des deux hémisphères sur la neige carbonique et réalisation de coupes coronales, C : conservation des coupes coronales dans des tubes Eppendorf contenant le milieu de conservation (FBS/DMSO)

### 1.3.3.2.. Technique d'immunohistochimie

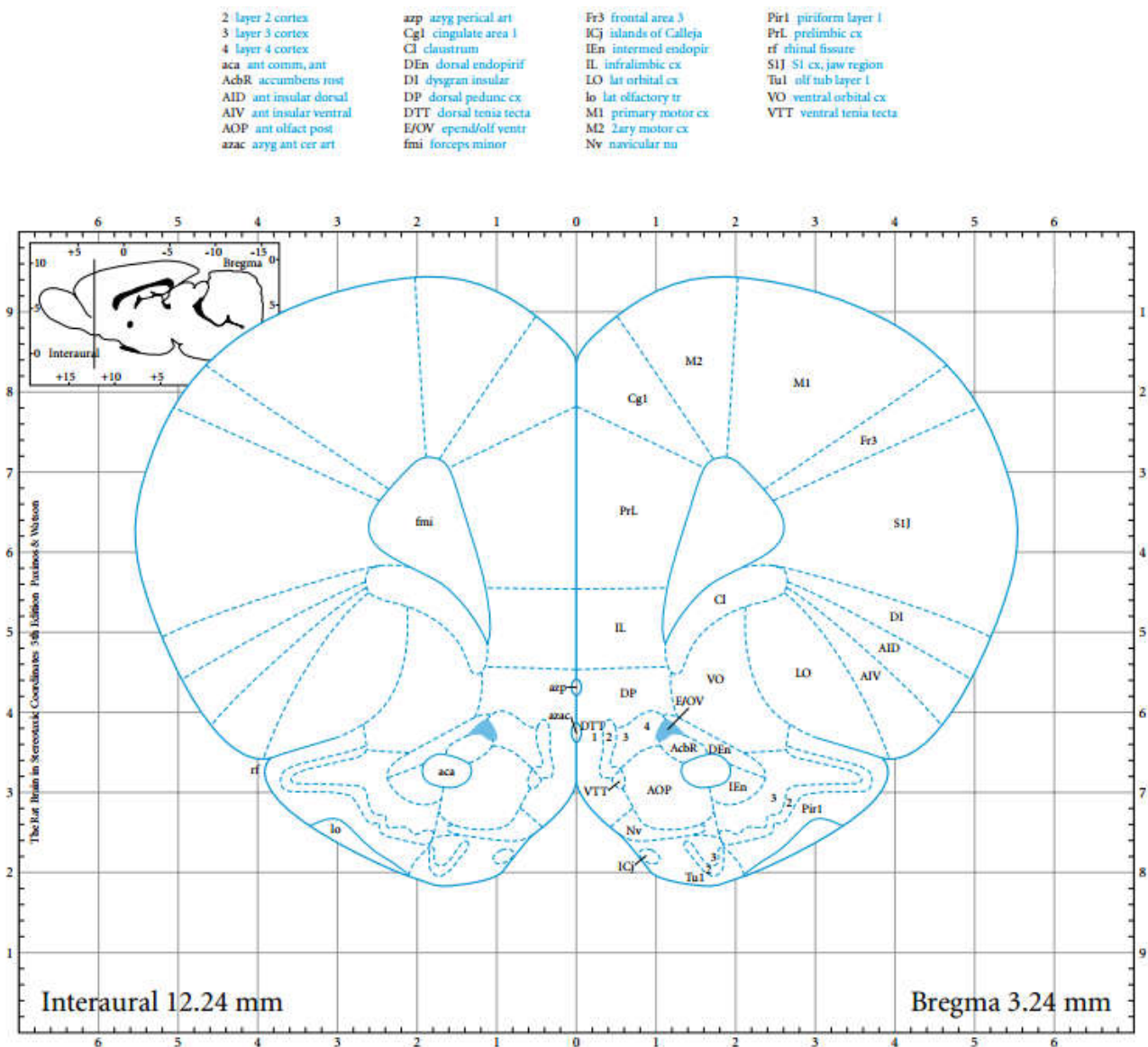
#### A. Fixation

Une décongélation rapide des coupes a été effectuée au bain-marie (37°C, 1 min) afin d'éliminer l'agent DMSO le plus rapidement possible car, à température ambiante, le DMSO présente une très forte toxicité pour les cellules en dénaturant les protéines et les lipides membranaires d'où la nécessité d'une décongélation très rapide. Des lavages au PBS préalables à la fixation sont nécessaires pour éliminer le maximum de DMSO qui est très miscible dans l'eau. La fixation proprement dite consiste à plonger les coupes dans le paraformaldéhyde 4% (PFA) pendant 4 heures à 4 C° pour préserver et stabiliser les épitopes protéiques. Une durée de fixation plus longue peut dénaturer les épitopes protéiques, par contre une fixation plus courte que la durée indiquée peut donner une mauvaise fixation. Après les 4 heures de fixation, une déshydratation dans un gradient de sucrose (15%, 30%) est effectuée sur toute la nuit. La décongélation et la fixation et les étapes suivant la confection des coupes ont été réalisées au niveau du laboratoire de pathogénèse et vaccination lentivirales, université Joseph Fourier, France.

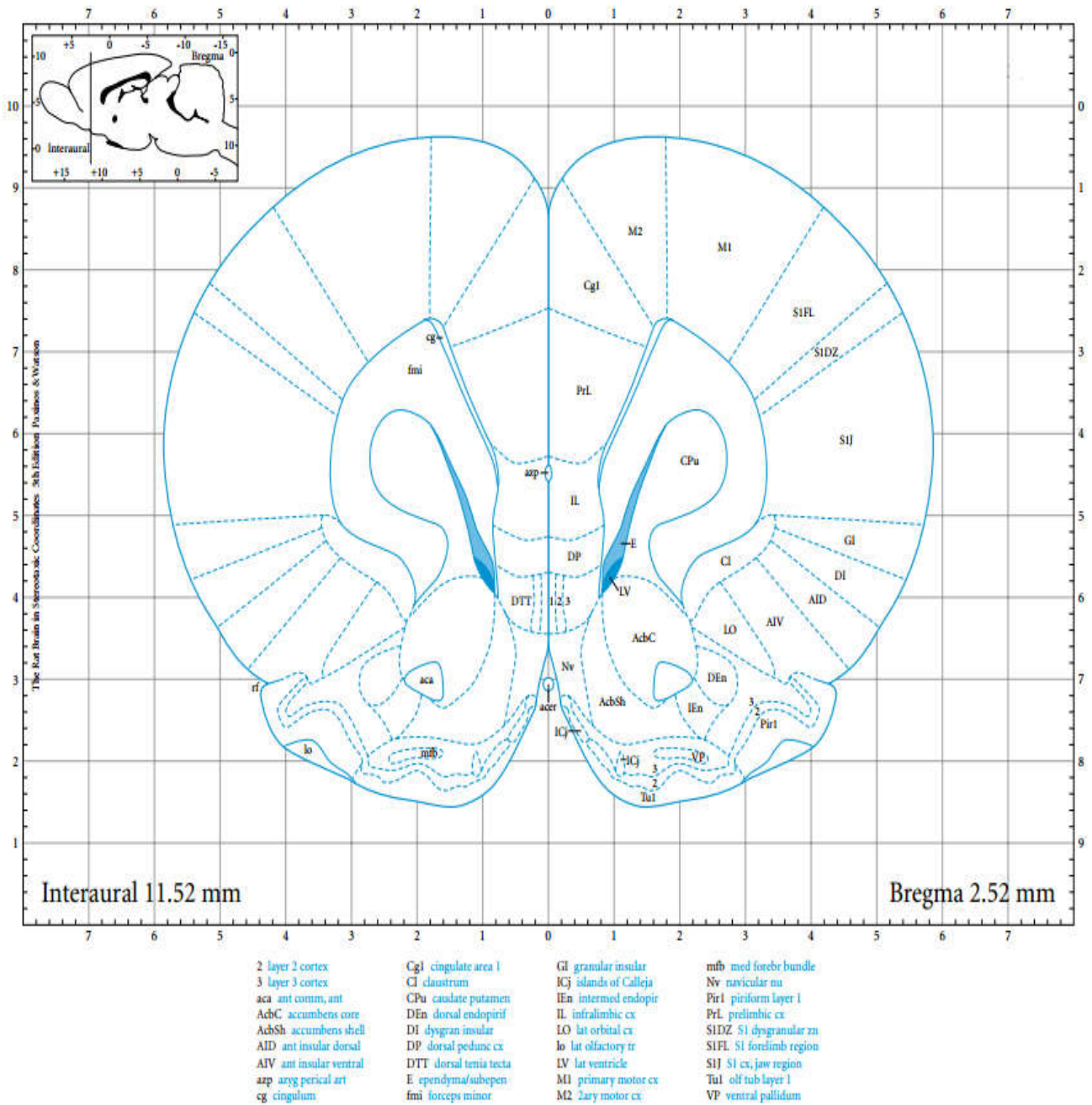
Un snapfreezing a été réalisé après une déshydratation en plongeant les coupes dans un bain d'isopentane (molécule chimiquement inerte) refroidi dans un bain de carboglace (-80°C) mélangée à l'éthanol à 90%. Les coupes ont été placées dans des cassettes d'immersion et conservées à -80C° jusqu'au jour de la confection des microsections au cryostat (Modèle : Cryostat Microm HM-560) au niveau de l'institut de neuroscience de Grenoble (GIN), université Joseph Fourier, Grenoble, France.

## B. Confection de microsections

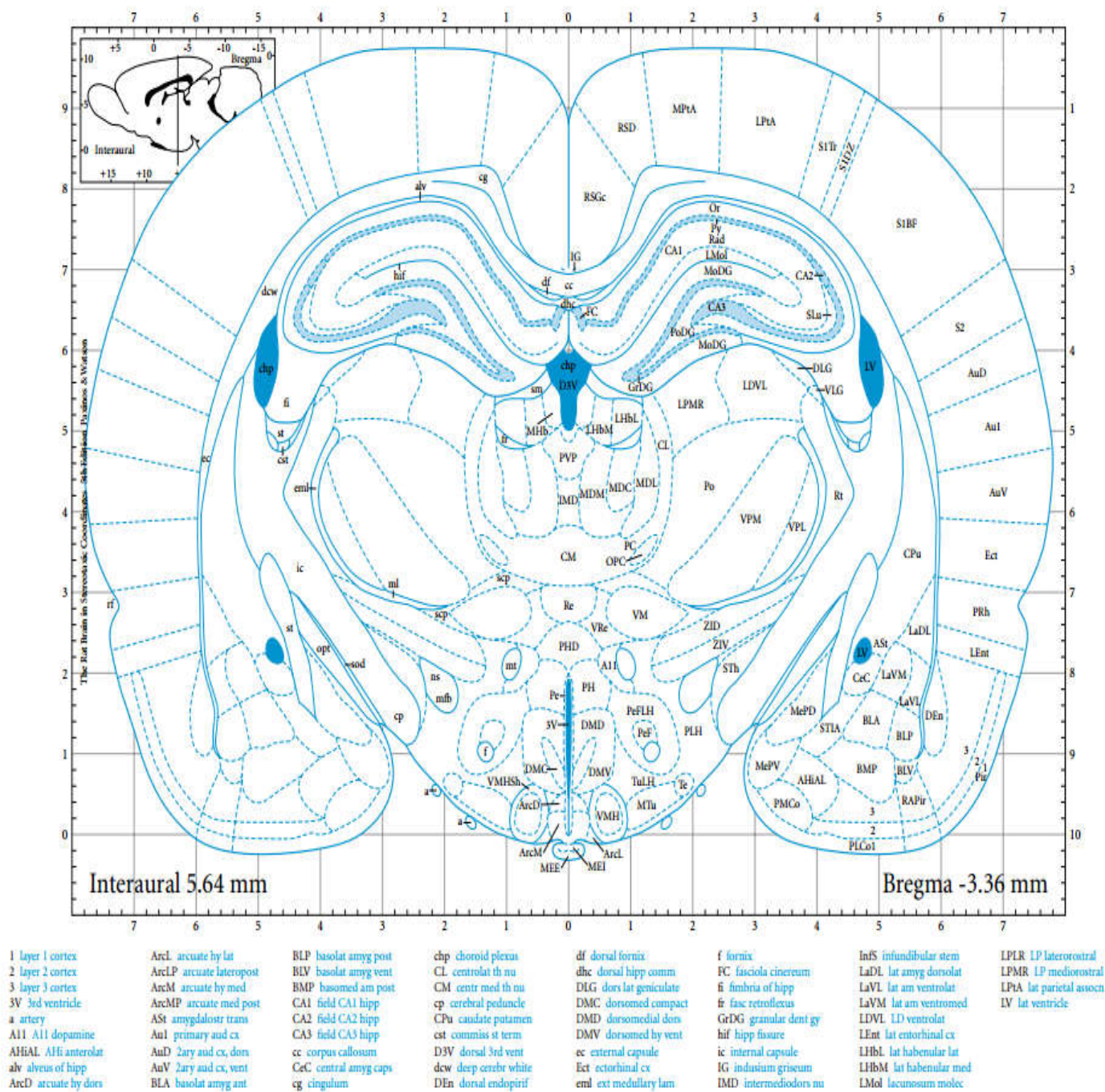
Un paramétrage préalable à la manipulation est nécessaire. La température du spécimen, du couteau et de la zone de refroidissement sont ajustée aux valeurs suivantes respectivement: -20°C, -20°C et -50°C. Les sections ont été réalisées dans le sens coronal et dont l'épaisseur est fixée à 40 microns. Nous nous sommes intéressés aux régions cérébrales suivantes : Cortex préfrontal, Cortex Moteur, Striatum (*caudal putamen*) et hippocampe dont la localisation est faite en référence au point Bregma (**Figure 14, 15 et 16**).



**Figure 14.** Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : Bregma 3.24 mm). Localisation du cortex préfrontale. Tiré de “*The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition*”, George PAXINOS et Charles WATSON [52].



**Figure 15.** Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : Bregma 2.52 mm). Localisation du striatum (*caudal putamen*). Tiré de "The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition", George PAXINOS et Charles WATSON [52].

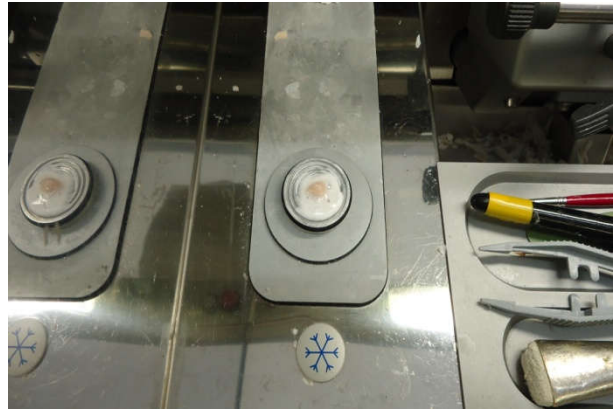


**Figure 16.** Schématisation de l'anatomie du cerveau (coupe coronale : Bregma -3.36 mm). Localisation de l'hippocampe. Tiré de "The rat brain in stereotaxic coordinates, fifth edition", George PAXINOS et Charles WATSON [52].

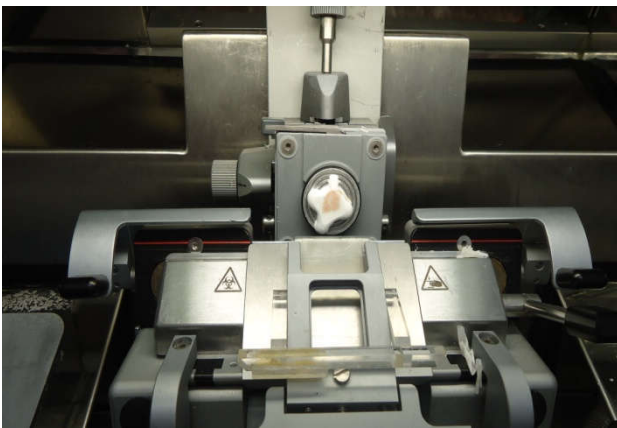
Pour une confection de microsections réussies, il est important de maintenir les échantillons à -80°C jusqu'au moment d'utilisation. Préalablement à la coupe proprement dite, chaque échantillon est retiré du congélateur et placé rapidement sur la zone refroidissante du cryostat. La platine porte-objet est alors refroidie sur la base refroidissante pour recueillir le gel *optimum cutting temperature* (OCT) Tissue-Tek® O.C.T. Compound de VWR, PROLAR. Ce dernier sert de matière d'enrobage pour l'échantillon, qui en se solidifiant, confère à l'échantillon une consistance pour une bonne résistance lors de la coupe. La platine porte-objet est refroidie une seconde fois afin de solidifier le gel OCT, puis montée sur le support porte-objet. Les coupes coronales sont réalisées grâce à la pédale qui fait bouger le microtome de pas de 40 microns. Les coupes sont au fur et à mesure récupérées à l'aide d'un pinceau fin et étalées délicatement dans des puits d'une plaque de culture cellulaire à 48 puits qui contiennent du tampon phosphate salin PBS/Azide (*phosphate buffered saline*, PBS/Azide). Les plaques sont numérotées et conservées à 4°C jusqu'à utilisation pour immunofluorescence (**Figure 17**).



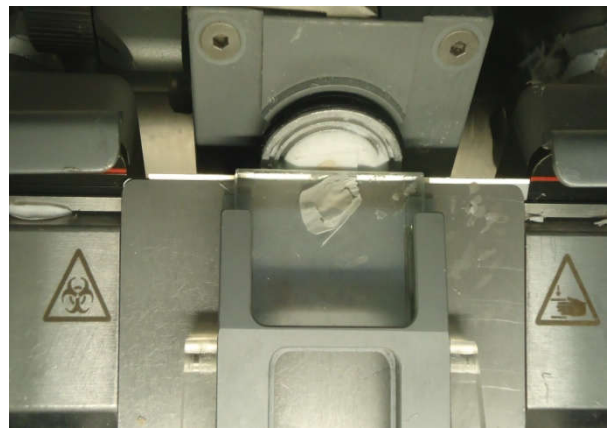
A



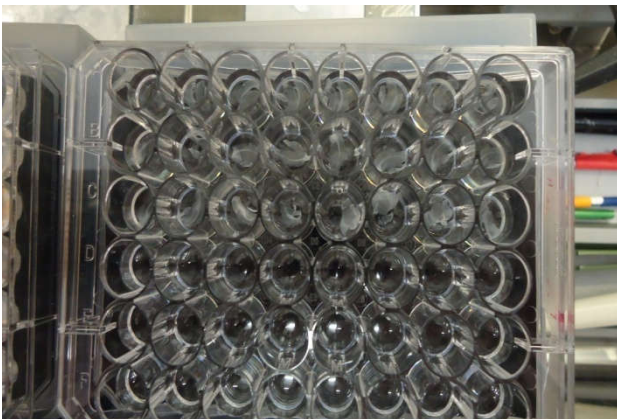
B



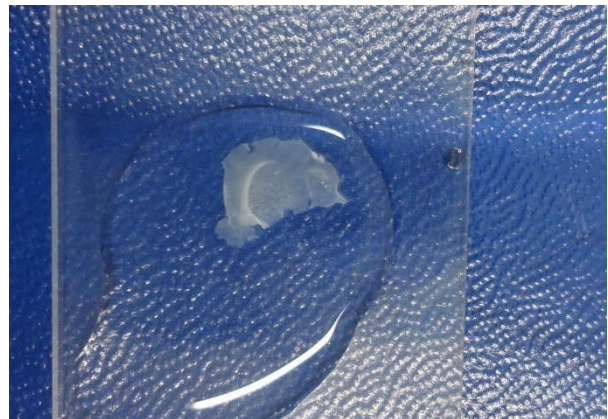
C



D



E



F

**Figure 17.** Microtome cryostat, Zone refroidissante, plaque de culture cellulaire contenant les cryosection dans du PBS azide, et une microsection recueillie sous la lame anti-roll. A : Vue d'ensemble de la chambre du Cryostat Microm HM-560. B : Refroidissement de la platine porte-objet sur la zone refroidissante. C : La platine porte-objet est fixée sur le support port objet. D : Lors de la coupe, les sections sont protégées par un système anti-roll (plaque en verre placée à l'horizontale). E : récupération et conservation des sections dans le PBS/Azide. F : Montage et étalement d'une coupe dans une goutte d'eau.

### C. Immunohistochimie par immunofluorescence indirecte (IFI)

Afin de déterminer la présence et la densité des récepteurs à IL2 (IL2R ou CD25) au niveau du cerveau par immunomarquage, les cerveaux ont été extraits et conservés puis fixés et coupés en microsections de 40 microns. Les sections ont été conservées dans du PBS/Azide jusqu'au moment d'utilisation. Le profil d'expression des CD25 dans le cerveau des rats stressés et non-stressés est déterminé par immunofluorescence indirecte.

- **Principe de la technique**

L'IFI repose sur une réaction spécifique entre un anticorps spécifique à l'antigène recherché, en l'occurrence, les CD25. La technique consiste à diriger un anticorps primaire contre les CD25 éventuellement exprimés à la surface des cellules du système nerveux. Afin de mettre en évidence les anticorps primaires fixés sur leur site de liaisons, un anticorps secondaire conjugué à un fluorochrome dirigé contre les IgG du rat a été utilisé. Plusieurs combinaisons Ac primaire/Ac secondaire a été testées pour en déterminer la meilleure (voir **Tableau 1**).

**Tableau 1.** Différente combinaisons d'anticorps primaires et secondaires utilisées. Mouse anti rat CD25 1 :100 : Ac primaire non conjugué produit chez la souris contre les CD25 du rat. Mouse anti rat CD25-B : Ac primaire conjugué à la biotine, produit chez la souris et dirigé contre les CD25 du rat. Donkey anti mouse IgG-Cy3 : Ac secondaire conjugué à la cyanine3, anti IgG de la souris et produit chez le singe. Donkey anti mouse IgG-FITC : Ac secondaire conjugué à la fluorescéine IsoThioCyanate. anti IgG de la souris et produit chez le singe. Donkey anti mouse IgG-488 : Ac secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488, produit chez le singe contre les IgG de la souris. Streptavidine-Cy3 : streptavidine liée au fluorochrome Cyanine 3

	1er test	2eme test	3eme test	4eme test	5eme test
<b>Ac primaire</b>	Mouse anti Rat CD25 1 :100	Mouse anti Rat CD25 1 :100	Mouse anti rat CD25-B 1 :500	Mouse anti rat CD25-B 1 :500	Mouse anti rat CD25-B 1 :500
<b>Ac secondaire</b>	Donkey anti mouse IgG-Cy3	Donkey anti mouse IgG-FITC	Donkey anti mouse IgG-Cy3	Donkey anti mouse-Alexa 488	Streptavidine-Cy3

La combinaison Ac primaire/Ac secondaire qui a donné la meilleure révélation est l'anticorps Souris anti Rat CD25 conjugué à la biotine (OX 39, 1 :500, BD Pharmingen) et en guise du marqueur secondaire : la streptavidine conjuguée à la Cyanine3 (Cy3). La streptavidine est une protéine bactérienne (*Streptomyces avidinii*) qui présente une très grande affinité pour la biotine. Lorsque la streptavidine marquée à la Cya 3 est liée à la biotine du primaire, le complexe émet une fluorescence rouge sous microscope à épifluorescence après une excitation à 550 nm. La technique d'immunofluorescence est décrite dans les étapes suivantes :

- Transfert des sections d'intérêt depuis PBS/azide dans des cupules dans une nouvelle boîte (à 48 puits) propre dans 500µl de PBS,
- Lavages au PBS 3 fois pendant 5 min chacune,
- Perméabilisation pendant 60min (0,5% triton 100X dans PBS; 5% Normal Goat Serum),
- Lavages au PBS 3 fois pendant 5 min chacune,
- Incubation avec l'Anticorps primaire (1 :500) sur la nuit dans un milieu : PBS 0,1% Tween 20 et 1% sérum normal de brebis (*Normal goat serum* : NGS), à 4°C sous agitation tout en couvrant les boîtes avec du parafilm pour éviter l'évaporation du PBS,
- Lendemain : 4 lavages de 10 min au PBS/Tween 20 à 0,1%,
- Incubation avec la streptavidine-Cy3 (1 :1000) pendant 2h dans un milieu RT (PBS + NGS + Triton x 100) sous agitation,
- 4 lavages de 10 min au PBS/Tween 20 à 0,1%,
- 1 lavage de 10 min au PBS + Hoeschst dilué au 1 :1000 (produit de contraste qui colore les noyaux cellulaires),
- Montage des coupes dans une goutte d'eau sur des lames,
- Aspiration de l'excès d'eau et sécher dans une goutte de RT à l'abri de la lumière,
- Application d'une goutte de milieu de montage pour fluorescence (DAKO *Fluorescent medium*) sur la coupe et recouvrir avec une lamelle,
- Visualisation au microscope à Fluorescence (Olympus CKX41).

La technique d'IFI et l'observation microscopique ont été réalisées dans le laboratoire de pathogénèse et vaccination lentivirales PAVAL Lab, université Joseph Fourier, Grenoble, France.

## 2. Etudes statistique :

En premier temps, l'hypothèse d'égalité des variances a été vérifiée avec le test de Bartlett en considérant que nos échantillons suivent une distribution normale. Dans le cas où l'hypothèse  $H_0$  est rejetée, on en conclut que les variances ne sont pas toutes égales, le test ANOVA est réalisé afin de déterminer le taux de variation entre groupes. Un test *post hoc* est nécessaire et adapté au type de la comparaison à faire ; Méthode de Dunnett en vue d'une comparaison multiple avec le groupe témoin et Méthode de Tukey pour une comparaison multiple entre groupes expérimentaux. Les données recueillies ont été analysées par le logiciel de traitement

statistique Minitab® 16.0 et les résultats sont exprimés en moyenne arithmétique ( $\bar{X}$ )  $\pm$  Erreur moyenne standard (SEM).

Les variations sont considérées comme :

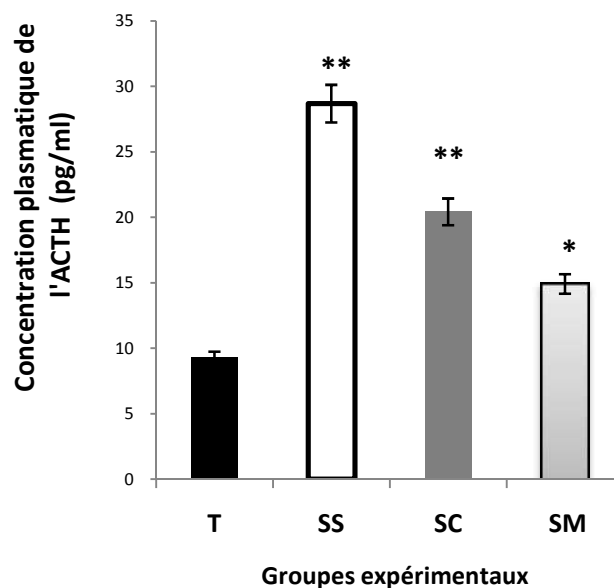
- Significatives :  $p < 0.05$ ,
- Hautement significatives :  $p < 0.01$ ,
- Très hautement significatives :  $p < 0.001$

Cependant, si le test d'égalité des variances révèle que les moyennes sont égales (cas de LDL-Cholestérol), le test de FISHER-SNECEDOR s'impose et la variation est considérée significative si la variable F observée ( $F_{\text{obs}}$ ) est supérieure à la valeur de F théorique (Table de Fisher-SNECEDOR).

# **RESULTATS**

## 1. Concentration plasmatique de l'ACTH

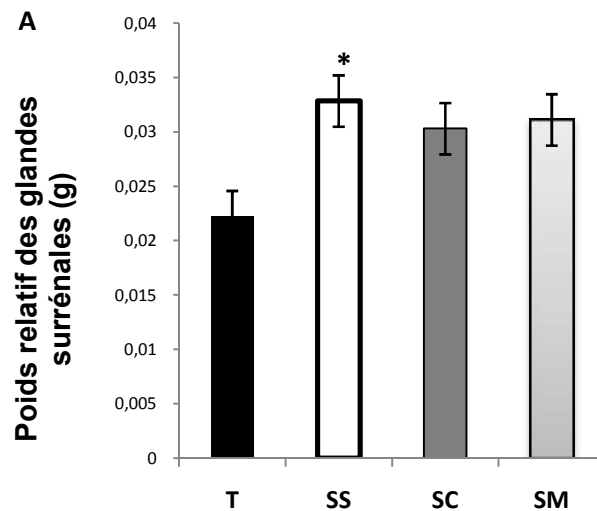
Les types de stress utilisés dans cette étude ont été validés par le dosage de l'ACTH chez les femelles gestantes à J19 de la conception et chez des mâles adultes. La validation consiste à vérifier que la durée et l'intensité des stressés utilisés dans notre protocole, et qui ne sont pas rapportés dans la littérature, avaient bel et bien mobilisé une réponse physiologique par stimulation de l'axe HPA. Quant au dosage de l'ACTH chez la progéniture, il a pour but la recherche de l'effet du stress prénatal sur la réactivité de l'axe HPA. En effet, les résultats du dosage, représentés dans la figure 18 ont montré que le groupe SS a connu la concentration la plus élevée d'ACTH (SS:  $28.69 \pm 1.83$  pg/ml Vs. T:  $9.28 \pm 1.83$  pg/ml,  $p = 0.002$ ). La concentration d'ACTH dans le groupe SC a également connu une élévation hautement significative comparativement au groupe témoin ( $20.43 \pm 2.61$  pg/ml,  $p=0.004$ ). Quant aux rats SM, ils ont montré une élévation significative modérée du taux plasmatique en ACTH par rapport aux rats témoins, et inférieure à celle enregistrée dans le groupe SS.



**Figure 18.** Concentration plasmatique de l'ACTH en pg/ml dans les 4 groupes de rats (N=6). (\*):  $p < 0.05$  Vs. témoin, (\*\*):  $p < 0.01$  Vs. Témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte, ACTH : hormone adénocorticotrope.

## 2. Poids relatifs des glandes surrénales

Le poids relatif des glandes surrénales reflète la proportion du poids absolu de ses glandes par rapport au poids total absolu de chaque rat. Le poids relatif des glandes surrénales a connu une augmentation significative uniquement dans le groupe SS par rapport au groupe T (SS:  $0.032852 \pm 0.000997$  g Vs. T:  $0.02223 \pm 0.00448$  g,  $p=0.049$ ) (Figure 19). L'augmentation a été également observée dans les deux autres groupes de stress mais elle reste sans aucune signification statistique : SC ( $0.03031 \pm 0.00278$  g,  $p=1.64$ ) et SM ( $0.03112 \pm 0.00282$  g,  $p>0.05$ ). Seul le stress sonore prénatal a induit une hypertrophie des surrénales. D'autre part, le poids relatif du cerveau a été significativement plus bas dans le groupe SS en comparaison avec les rats T (SS:  $0.6526 \pm 0.0581$  g, Vs. T:  $0.8465 \pm 0.0388$  g,  $p=0.024$ ). Cependant, comparativement au groupe T, aucune variation significative n'a été détectée dans le groupe SC ( $0.7763 \pm 0.0347$  g,  $p=0.215$ ) ni le groupe SM ( $0.7623 \pm 0.0336$  g,  $p=0.139$ ).



**Figure 19.** Poids relatif moyen des glandes surrénales en (g) dans les 4 groupes de rats (N=6). (\*) :  $p < 0.05$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

### 3. Etude comportementale

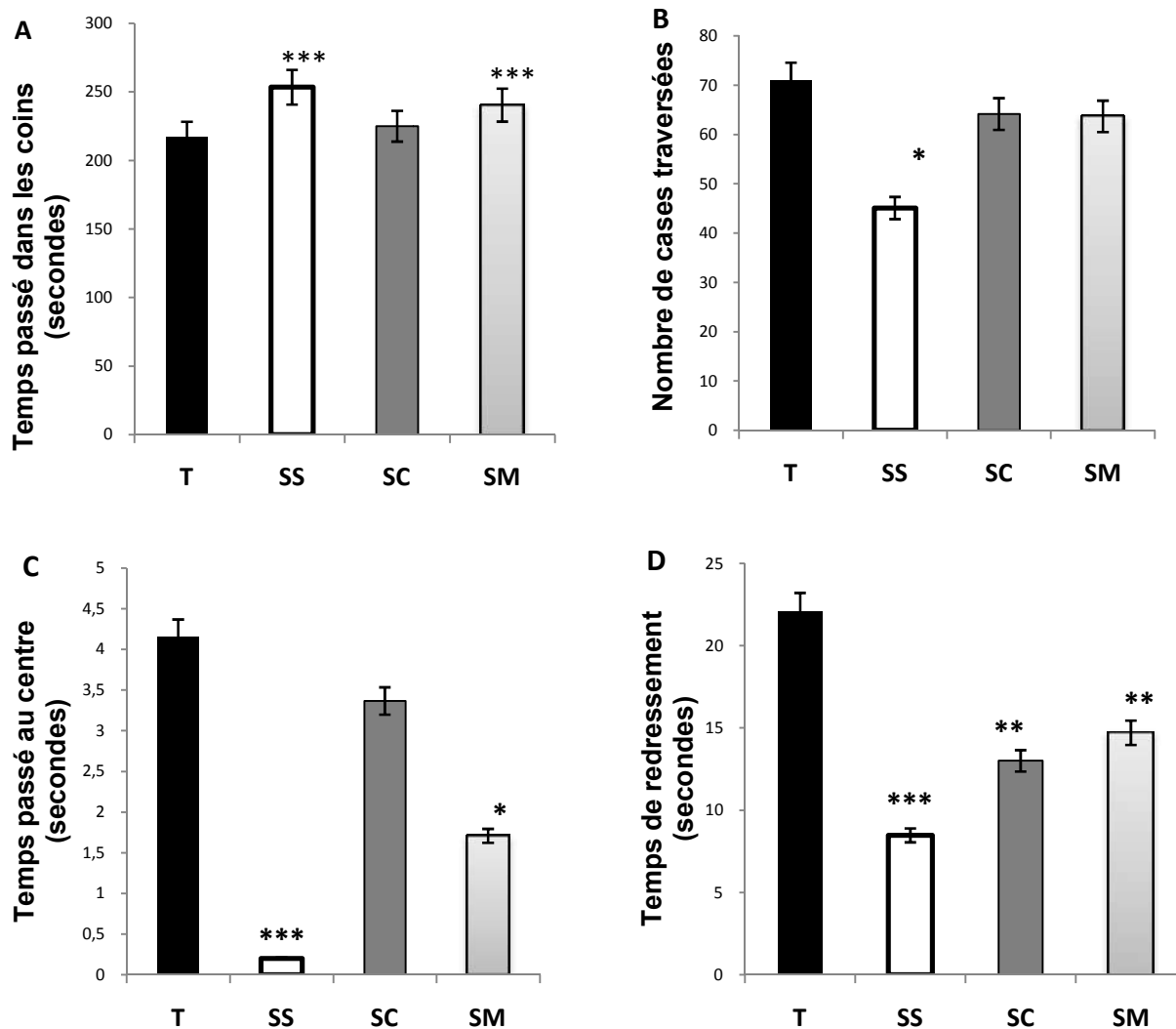
#### 3.1. Test du champ ouvert (*Open field test*)

Concernant le comportement exploratoire évalué par le temps passé dans les coins (Figure 20.A) les groupes SS et SM ont connu une augmentation très marquée en comparaison avec le groupe T avec respectivement ( $253.3 \pm 5.9$  s Vs  $217.29 \pm 6.57$  s ;  $p=0.000$ ) et ( $240.8 \pm 8.3$  s Vs  $217.29 \pm 6.57$   $p=0.037$ ). Pas de modifications notables chez les rats SC ( $214.8 \pm 13$ ,  $p>0.05$ ).

Par contre, selon le temps passé dans le centre (Figure 20.C) les groupe SS et SM ont connu une baisse considérable respectivement ( $0.2 \pm 0.145$  s Vs.  $4.158 \pm 0.785$ ,  $p= 0.0001$ ) et  $1.70 \pm 0.56$  s,  $p =0.018$ ). Aucune altération significative de l'exploration n'a été enregistrée dans le cas des rats SC ( $3.36 \pm 0.76$ ,  $p > 0.05$ ).

Quant à la distance parcourue représenté par le nombre de cases traversées (Figure 20.B) traduisant à la fois l'activité locomotrice et l'exploration horizontale, a été diminuée significativement dans le groupe SS ( $45.07 \pm 5.56$  Vs.  $71.00 \pm 6.20$ ,  $p=0.006$ ). Par contre, aucune différence significative n'a été détectée dans les deux autres groupes SC ( $p=0.420$ ) et SM ( $p=3.25$ ).

Pareillement, l'exploration verticale, représentée par le temps de redressement (Figure 20.D), a été réduite quelques soient les rats froupes expérimentaux, de manière hautement significative chez les rats SS ( $8.47 \pm 1.82$  s Vs.  $22.11 \pm 2.17$  s,  $p < 0.001$ ), moins prononcée dans les groupes SC ( $13 \pm 1.46$ ,  $p < 0.01$ ) et SM ( $14.70 \pm 1.65$ ,  $p < 0.01$ ).

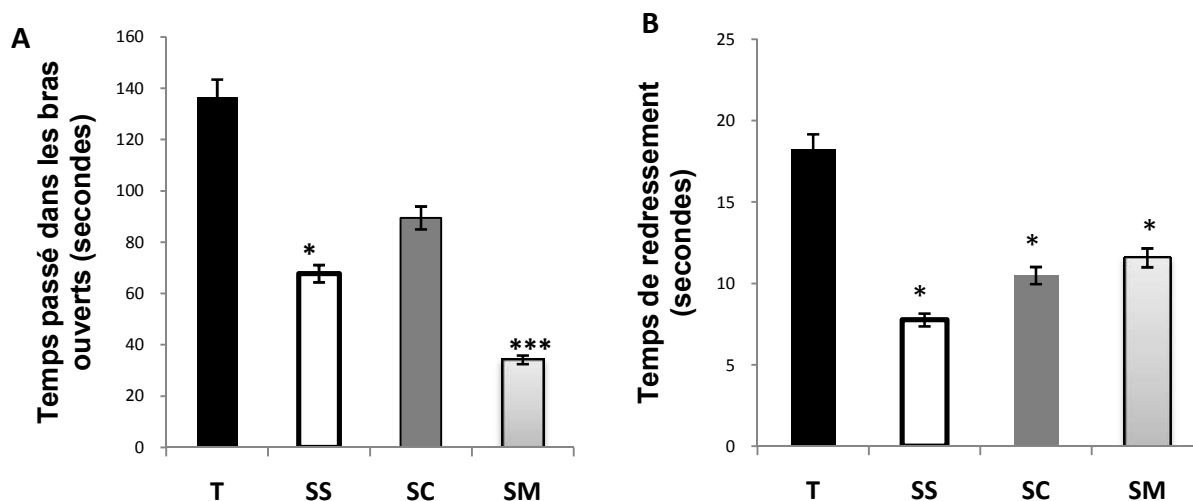


**Figure 20.** Variation des paramètres du test du champ ouvert; Temps passé dans les coins par secondes (A), nombre de cases traversées (B), temps passé au centre par secondes (C) et temps de redressement par secondes (D). (N=16). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. (\*) :  $p < 0.05$  Vs. témoin, (\*\*) :  $p < 0.01$  Vs. témoin, (\*\*\*) :  $p < 0.001$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

### 3.2. Test de la croix surélevée (*Elevated plus maze*)

L'évaluation de l'état émotionnel des rats a montré que le temps passé dans les bras ouverts, paramètre inversement corrélé avec le niveau d'anxiété [53], est hautement réduit dans le lot SM ( $34.14 \pm 8.91$  s, Vs. T:  $136.53 \pm 13.91$  s,  $p < 0.001$ ). Même en comparaison avec les rats SS et SC, Le niveau d'anxiété est plus marqué dans le lot SM Vs. SS ( $p = 0.025$ ) et SM Vs SC ( $p = 0.001$ ) Cette diminution de temps passé dans les bras ouverts est moins marquée dans le groupe SS Vs. témoins, bien qu'elle soit statistiquement hautement significative (Respectivement:  $67.69 \pm 11.03$  s,  $p = 0.014$ ). Cependant, aucune variation significative de ce paramètre n'a été enregistrée dans le groupe SC en comparaison avec les témoins (SC:  $89.41 \pm 12.31$  s,  $p = 0.117$ ). (Figure 21.A).

Concernant l'exploration horizontale dans le test de la croix surélevée, les résultats concordent avec ceux obtenus dans le test du champ ouvert. En effet, le temps de redressement a connu une baisse significative et ce dans les 3 groupes de stress prénatal en comparaison avec le groupe témoin SS ( $7.76 \pm 1.15$  s,  $p = 0.0016$ ), SS ( $10.5 \pm 1.95$  s,  $p = 0.022$ ) et SM ( $11.58 \pm 1.37$  s,  $p = 0.045$ ). Outre le comportement exploratoire qui a été altéré d'une manière comparable dans tous les groupes stressés, le degré d'anxiété a été exacerbé chez les rats SM.

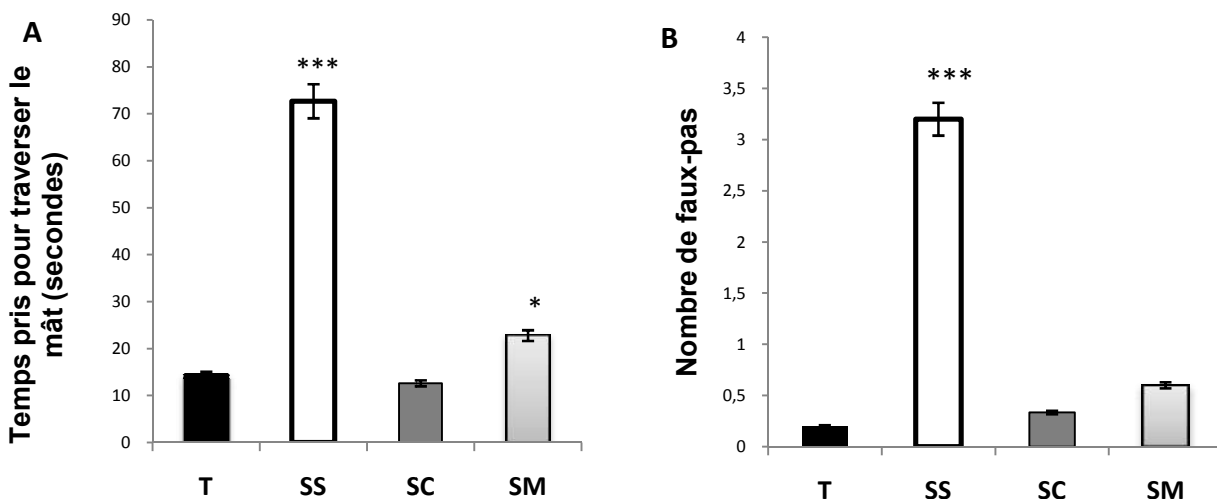


**Figure 21.** Variation des paramètres du test de la croix surélevée; Temps passé dans les bras ouverts par seconde (A), temps de redressement par secondes (B). (N=16). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. (\*) :  $p < 0.05$  Vs. témoin. (\*\*) :  $p < 0.01$  Vs. témoin, (\*\*\*) :  $p < 0.001$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

### 3.3. Test du mât arrêté

Le test de l'équilibre dans des conditions stationnaires sur un mât arrêté a révélé une augmentation considérable du temps mis par les rats SS pour traverser la barre du test par rapport aux rats T ( $72.7 \pm 16.8$  s Vs.  $14.33 \pm 1.26$ s,  $p=0.002$ ) (Figure 22.A). Une prolongation de ce temps a été également observée dans le groupe SM avec une variation significative ( $22.75 \pm 3.13$ s,  $p=0.021$ ). Cependant, la variation de ce temps n'avait aucune signification statistique dans le cas du lot SC ( $11.92 \pm 2.90$ s,  $p=0.792$ ).

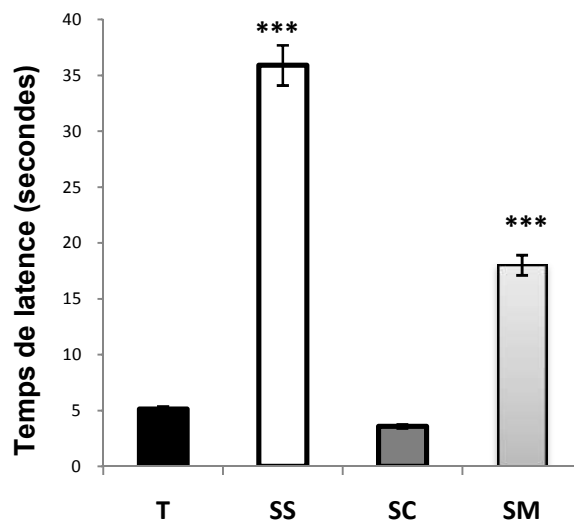
Par ailleurs, il est reconnu que le test du mat arrêté est un test anxiogène en raison de sa barre étroite et qui se trouve élevée du sol. Pour une meilleure évaluation des performances motrices de l'animal sans pour autant les confondre avec le « comportement anxieux » du à la contrainte d'un espace ouvert et élevé, un autre paramètre spécifique à la coordination motrice a été relevé. Il s'agit du nombre de « faux-pas » ou trébuchement [54]. Les résultats collectés ont bien montré que seul les rats SS avaient un nombre très élevé de faux-pas relativement au groupe T ( $3.2 \pm 0.619$  Vs.  $0.20 \pm 0.107$ ,  $p=0.0001$ ), et par rapport au groupe SC ( $0.333 \pm 0.211$ ,  $p=0.0001$ ). Comparativement aux rats témoins, aucune variation significative n'a été relevée dans le cas des rats SC ( $p=0.567$ ) et SM ( $0.600 \pm 0.273$ ,  $p=0.180$ ) (Figure 22.B).



**Figure 22.** Variation des paramètres du test du mât arrêté; Temps pris pour traverser le mât par secondes (A), nombre de faux-pas sur la barre du mât arrêté (B). (N=16). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SEM. (\*) :  $p < 0.05$  Vs. témoin, (\*\*) :  $p < 0.01$  Vs. témoin, (\*\*\*) :  $p < 0.001$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

### 3.4. Test olfactif : reconnaissance de l'odeur maternel

L'analyse préliminaire d'ANOVA *one way* a révélé qu'il existe une variation très hautement significative du temps de latence entre les quatre groupes de rats ( $p=0.000$ ). Une comparaison par paire entre le groupe témoin et les groupes de stress montre que seuls les groupes SS et SM ont connu une hausse significative du temps de latence par rapport au groupe T ; SS ( $35.89 \pm 4.13s$ ,  $p=0.000$ ); SM ( $18 \pm 1.73s$ ,  $p=0.000$ ), T ( $5.11 \pm 0.6s$ ). Cependant, aucune variation significative du temps de latence n'a été détectée entre le groupe SC et le groupe témoin (SC :  $3.57 \pm 0.57s$ ,  $p=0.87$ ). Ces résultats sont illustrés graphiquement dans la Figure 23.

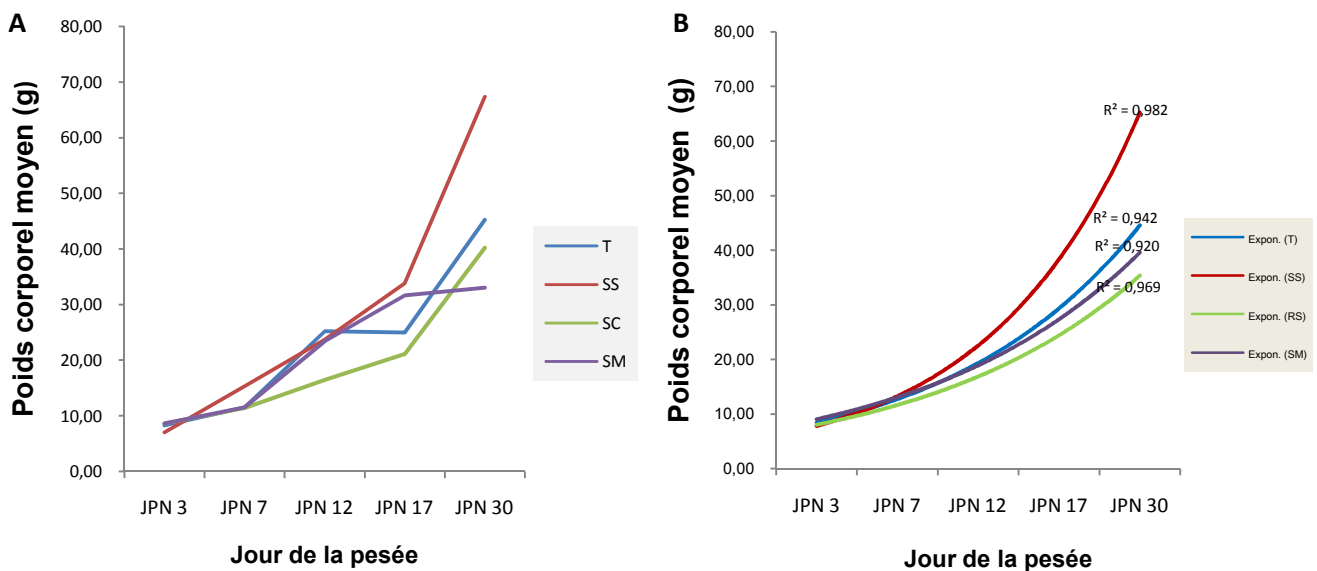


**Figure 23.** Variations du temps de latence par secondes dans le test olfactif enregistrées dans les 4 groupes de rats. (N=16). Valeurs exprimés en moyenne de temps de latence (secondes)  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test. (\*\*\*) :  $p < 0.001$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

## 4. Paramètres physiologiques et biochimiques

### 4.1. Suivi du poids corporel

Les courbes de la figure 24 montrent l'évolution des poids corporels moyens des différents groupes de rats. La prise du poids s'étend sur la période allant du 3<sup>ème</sup> au 30<sup>ème</sup> jour post-natal. Initialement les rats de tous les groupes présentaient le même poids moyen. Nous avons constaté que le poids corporel moyen des rats soumis au stress sonore croissait plus que celui de des rats témoins, contrairement aux deux autres groupes de stress. Il est très clair selon la courbe que les rats SS ont connu une plus grande prise pondérale par rapport aux trois autres groupes et ce, depuis le 7<sup>ème</sup> jour de vie et qui continue jusqu'au 30<sup>ème</sup> jour. Les rats SC et SM avaient un poids corporel moyen inférieur aux témoins.

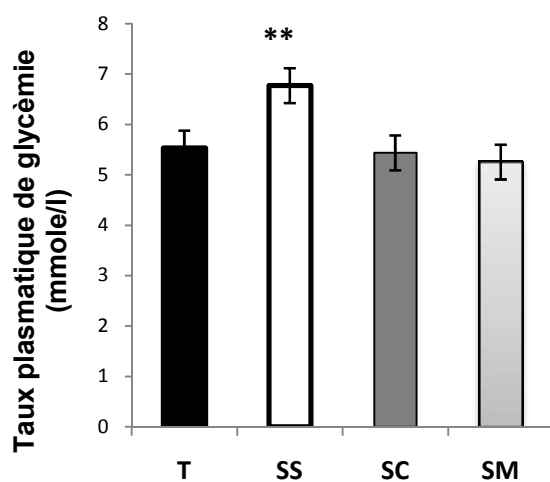


**Figure 24.** Fluctuation du poids corporel moyen (g) dans les 4 groupes de rats (A), et courbe de tendance de la fluctuation du poids corporel moyen (B). (N=16). T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

## 4.2. Glycémie

Un test d'homogénéité des variances a été effectué selon la méthode de Bartlett pour détecter la variation des taux de glycémie entre les différents groupes de stress. Ensuite, la comparaison des moyennes par paire est effectuée par ANOVA one way, suivie par des tests *post hoc* appropriés ; test Dunnett: quand la comparaison par paire est effectuée avec le groupe control ; test Tukey : comparaisons multiples entre groupes de stress.

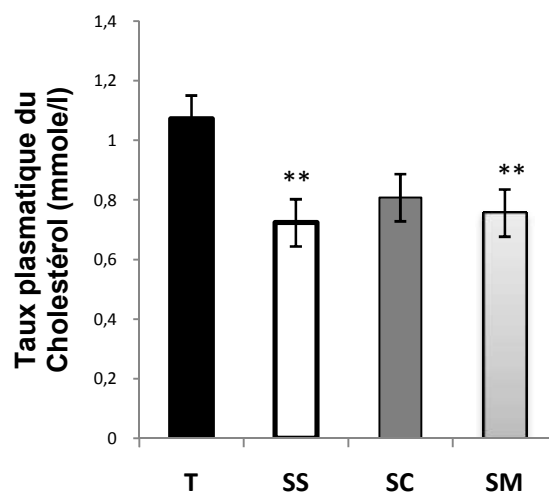
La **figure 25** résume le résultat du dosage de la glycémie plasmatique dans les 4 groupes de cette expérimentation. Nous pouvons constater qu'il existe une augmentation hautement significative de la glycémie dans le groupe SS comparativement au groupe témoin (SS :  $7.287 \pm 0.562$  mmole/l, Vs. T:  $4.481 \pm 0.426$  mmole/l,  $p=0.004$ ). Le taux de glycémie dans le groupe SC et SM reste comparable à celui du groupe contrôle sans variation significative SC ( $6.94 \pm 1.07$  mmole/l,  $p=0.065$ ) et SM ( $5.254 \pm 0.364$  mmole/l,  $p=0.2$ ). Il semble que les rats SC et SM ont pu garder une normoglycémie (en référence à notre groupe témoin). Alors que les rats SS manifestement ont tendance à développer une hyperglycémie à jeun.



**Figure 25.** Taux de glycémie (mmole/l) enregistrée dans les 4 groupes de rats. (N=6). Les concentrations sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test, \*\*  $p < 0.01$  par rapport au groupe témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

### 4.3. Cholestérolémie

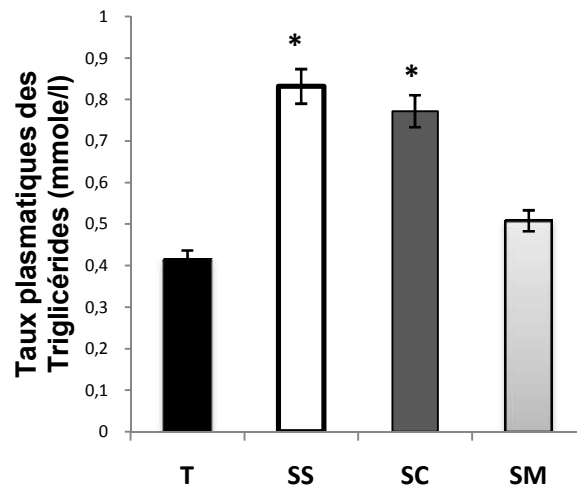
Les résultats illustrés dans la figure 26 montrent les concentrations plasmatiques du cholestérol obtenues dans les 4 lots. Seuls les rats SS et SM ont marqué des concentrations nettement plus basses que celle du témoin. La variation étant hautement significative dans ces deux groupes en comparaison avec le groupe T ; SS ( $0.724 \pm 0.155$  mmole/l,  $p=0.016$ ), SM ( $0.757 \pm 0.102$  mmole/l,  $p=0.005$ ) et T ( $1.2720 \pm 0.0914$  mmole/l). Par ailleurs, et bien que le taux de cholestérol dans le groupe SC est statistiquement sans signification, la cholestérolémie reste clairement plus basse que la valeur observée chez les témoins.



**Figure 26.** Taux du cholestérol plasmatique (mmole/l) dans les 4 groupes de rats. (N=6)  
Les concentrations sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test, (\*\*):  $p < 0.01$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

#### 4.4. Triglycéridémie

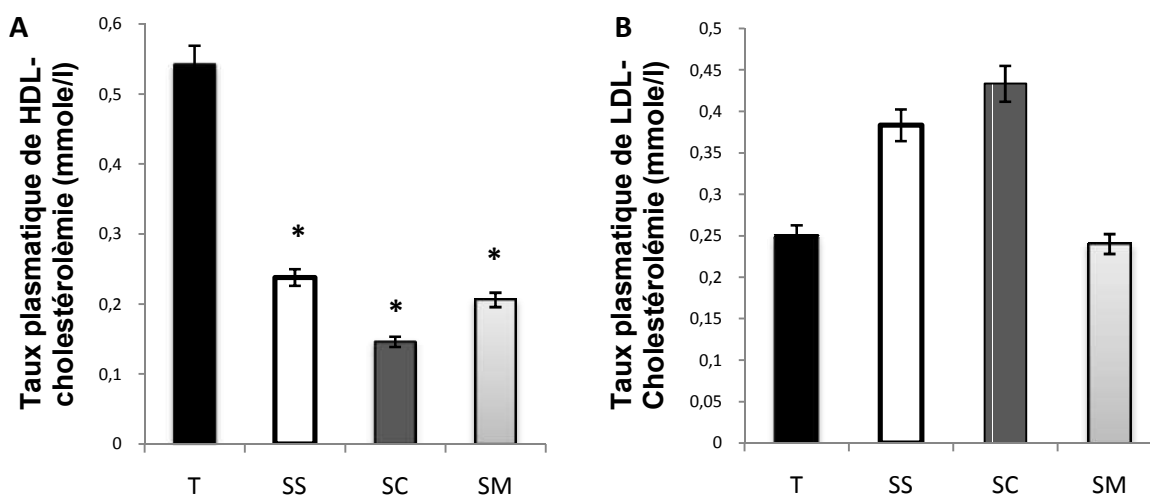
Les taux de TG observés dans les 4 groupes expérimentaux montrent que seuls les rats NS et RS ont connu une élévation de la triglycéridémie par rapport au groupe témoin SS ( $p=0,030$ ) et SC ( $p=0,032$ ). Cependant, cette élévation est également observée dans le lot SM, sauf qu'elle reste statistiquement insignifiante et comparable aux rats témoins ( $p=0,311$ ) (Figure 27).



**Figure 27.** Taux plasmatique des Triglycérides dans les 4 groupes de rats. (N=6). Les concentrations sont exprimées en moyenne (mmole/l)  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test, (\*\*):  $p < 0.01$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

#### 4.5. HDL- et LDL-Cholestérolémie

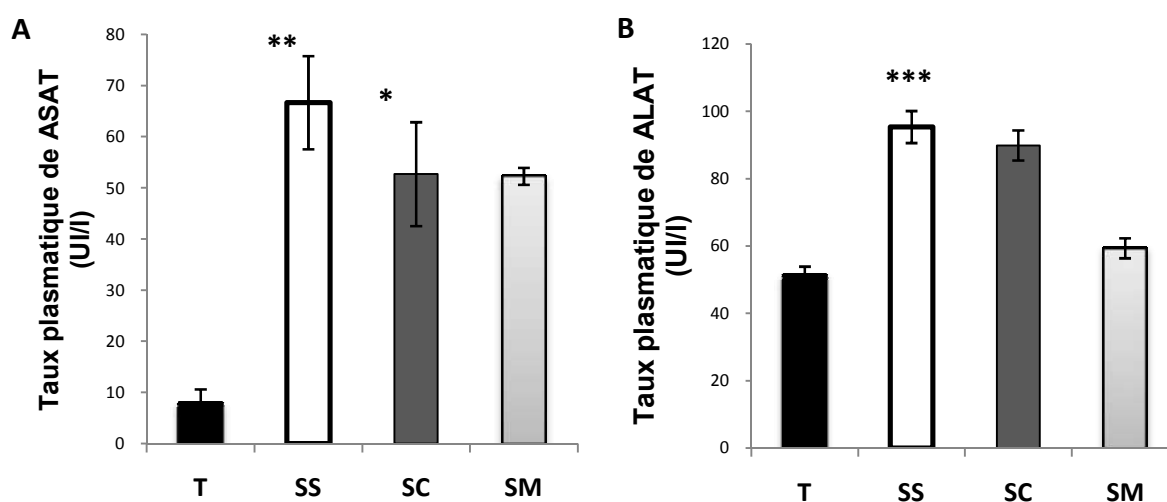
Il est clair dans la figure 28.A qu'une baisse très importante du HDL-cholestérol a touché les 3 groupes de stress prénatal d'une manière significative ( $p < 0,05$ ) (Figure 28.A). Par ailleurs, le test d'égalité des variances a révélé qu'il n'y a pas de variation significative dans les taux de LDL-Cholestérol entre les 4 groupes (Figure 28.B). Dans ce cas, nous avons eu recours au test de FISHER-SNECEDOR pour des comparaisons multiples deux à deux avec la condition d'égalité des moyennes. Aucune variation significative n'a été détectée par ce test. Cependant, nous pouvons admettre que les valeurs de LDL-Cholestérol enregistrées dans les groupes de stress ont tendance à être plus élevées que celles du groupe témoin.



**Figure 28.** Taux plasmatique de HDL-Cholestérol (A) et LDL-Cholestérol (B) en mmole/l dans les 4 groupes de rats. (N=6). Les concentrations sont exprimées en moyenne (mmole/l)  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test pour HDL et test de Fischer-Snedecor pour LDL, (\*) :  $p < 0.01$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

#### 4.6. Transaminases ASAT et ALAT

Les transaminases, paramètres marqueurs de l'activité hépatique, ont connu une hausse considérable dans leur concentration plasmatique notamment dans le groupe SS par rapport au groupe T ; (ASAT  $p=0,031$ , ALAT  $p=0,000$ ). Seuls les ASAT ont augmenté significativement dans le lot SC (ASAT :  $p=0,024$ , ALAT :  $p=0,09$ ). Par contre, malgré la hausse de concentration des transaminases, le test ANOVA n'a révélé aucune variation significative dans le groupe SM comparativement au groupe T (ASAT :  $p=0,11$ , ALAT :  $p=0,52$ ) (Figure 29). Les concentrations plasmatiques moyennes des transaminases dans nos 4 lots de rats sont présentées dans le tableau 2.



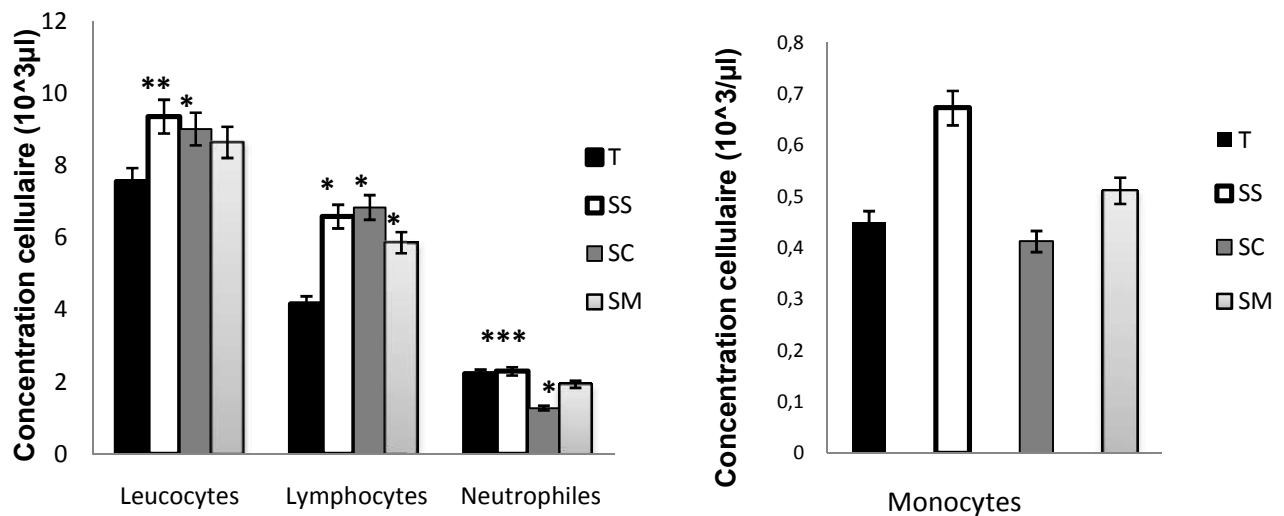
**Figure 29.** Taux plasmatique des transaminases : ASAT (A) et ALAT (B) par unité internationale/l dans les 4 groupes de rats (N=6). Les concentrations sont exprimées en moyenne (mmole/l)  $\pm$  SEM et les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test, (\*\*):  $p<0.01$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

**Tableau 2.** Taux plasmatiques des transaminases ASAT et ALAT (UI/l)

		T	SS	SC	SM
ALAT (UI/l)	Moyenne	51,33	95,37*	89,90	59,32
	SEM	8,81	15,83	31,68	7,64
ASAT (UI/l)	Moyenne	7,9	66,67***	52,71*	52,28
	SEM	2,7	9,12	10,15	1,65

#### 4.7. Formule numérique sanguine- énumération des cellules immunitaires circulantes

La formule numérique sanguine de la progéniture réalisé à JPN 48 a révélé que le stress sonore appliqué seul induit une leucocytose; augmentation hautement significative des globules blancs ( $p=0.016$ ), une lymphocytose significative ( $p=0.012$ ), une neutrophilie hautement significative ( $p=0,031$ ) et une monocytose non significatives ( $p= 0.641$ ) (Figure 30). Toutefois, chez le groupe SC, nous avons observé une neutropénie hautement significative ( $p=0.031$ ) accompagnée d'une lymphocytose significative ( $p=0.045$ ) ainsi qu'une monocytopenie ( $p=0.7$ ). Par contre, il a été constaté dans le groupe SM, que les concentrations de leucocytes, neutrophiles et monocytes étaient toutes comprises entre les valeurs observées dans les rats SS et SC. Ses variations sont statistiquement non significatives par rapport au témoin (Leucocytes :  $p=0.12$  ; Neutrophiles :  $p=0.644$  ; Monocytes :  $p=0.9$ ). Les concentrations des cellules immunitaires circulantes sont présentées dans le tableau 3.



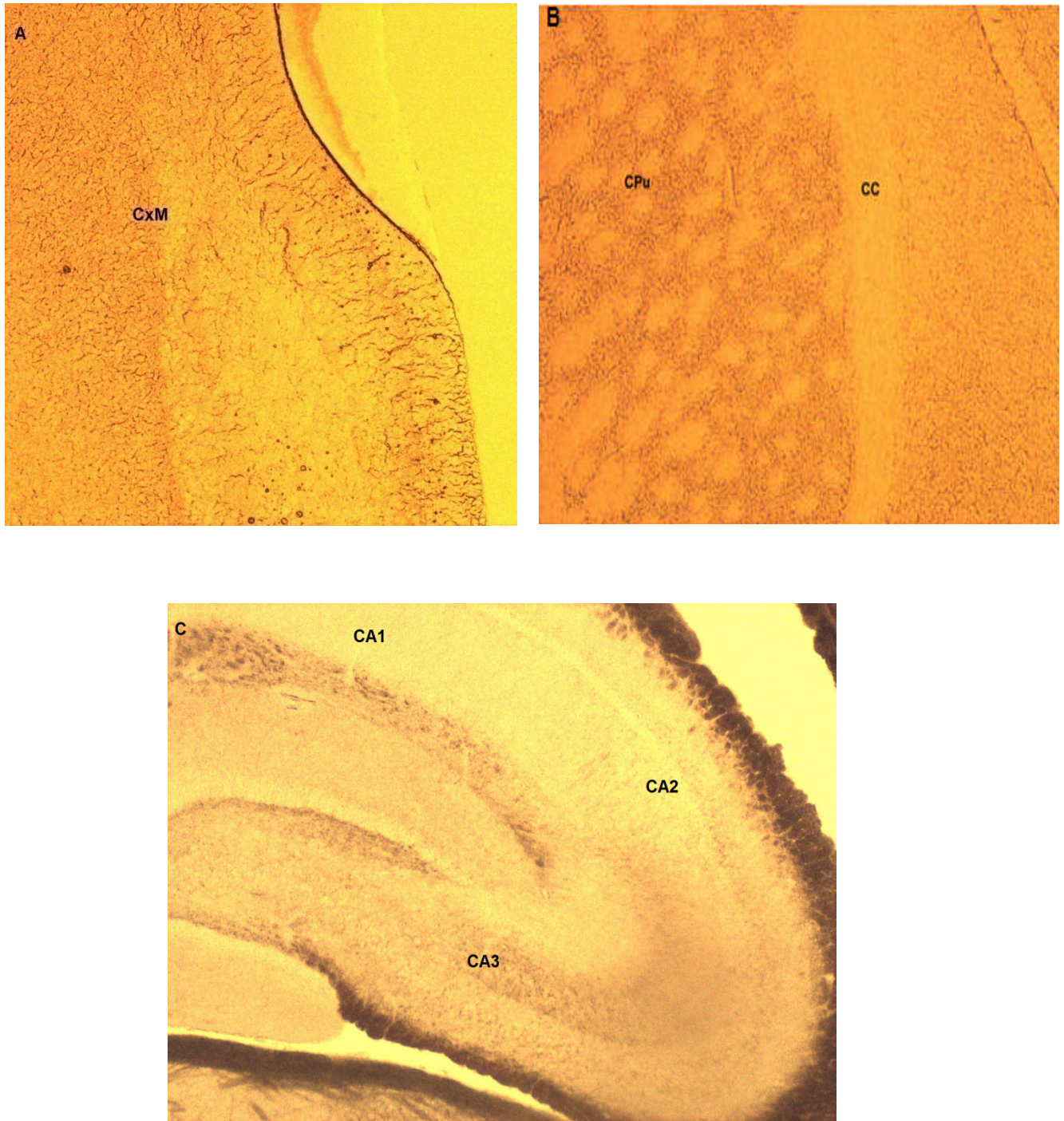
**Figure 30.** Numération sanguine de cellules immunitaires circulantes dans les 4 groupes expérimentaux. (N=6). Les concentrations sont exprimées en moyenne ( $10^3$  cellules/ $\mu$ l)  $\pm$  SEM. Les variations sont déterminées par ANOVA à un facteur, Tukey's t-test, (\*\*):  $p < 0.01$  Vs. témoin. T : témoin, SS : stress sonore, SC : stress de contention et SM : stress mixte.

**Tableau 3.** Concentration de certaines cellules immunitaires circulantes ( $10^3$ cellules/ $\mu$ l)  
T : contrôle, SS : stress sonore, SC : stress de contention, SM : stress mixte

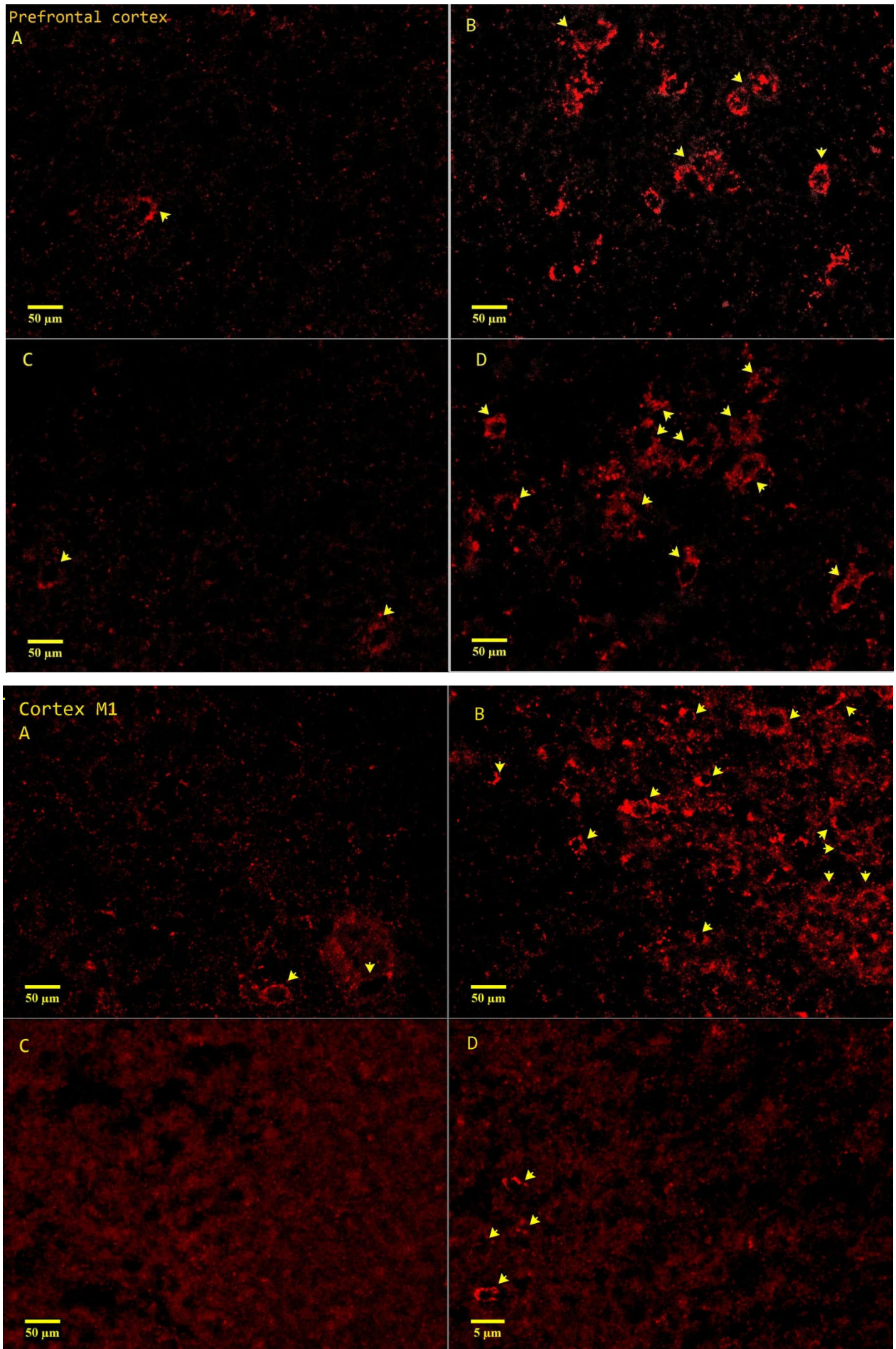
	<i>Leucocytes</i>	<i>Lymphocytes</i>	<i>Neutrophiles</i>	<i>Monocytes</i>
<b>T</b>	7.55 $\pm$ 0.8	4.16 $\pm$ 0.13	2.23 $\pm$ 0.33	0,45 $\pm$ 0.07
<b>SS</b>	9.35 $\pm$ 1.63**	6.58 $\pm$ 1.36*	2.3 $\pm$ 0.12***	0,67 $\pm$ 0.22
<b>SC</b>	9.01 $\pm$ 1.03*	6.83 $\pm$ 1.51*	1.28 $\pm$ 0.1*	0,41 $\pm$ 0.1
<b>SM</b>	8.63 $\pm$ 0.33	5.86 $\pm$ 0.63*	1.93 $\pm$ 0.04	0,51 $\pm$ 0.18

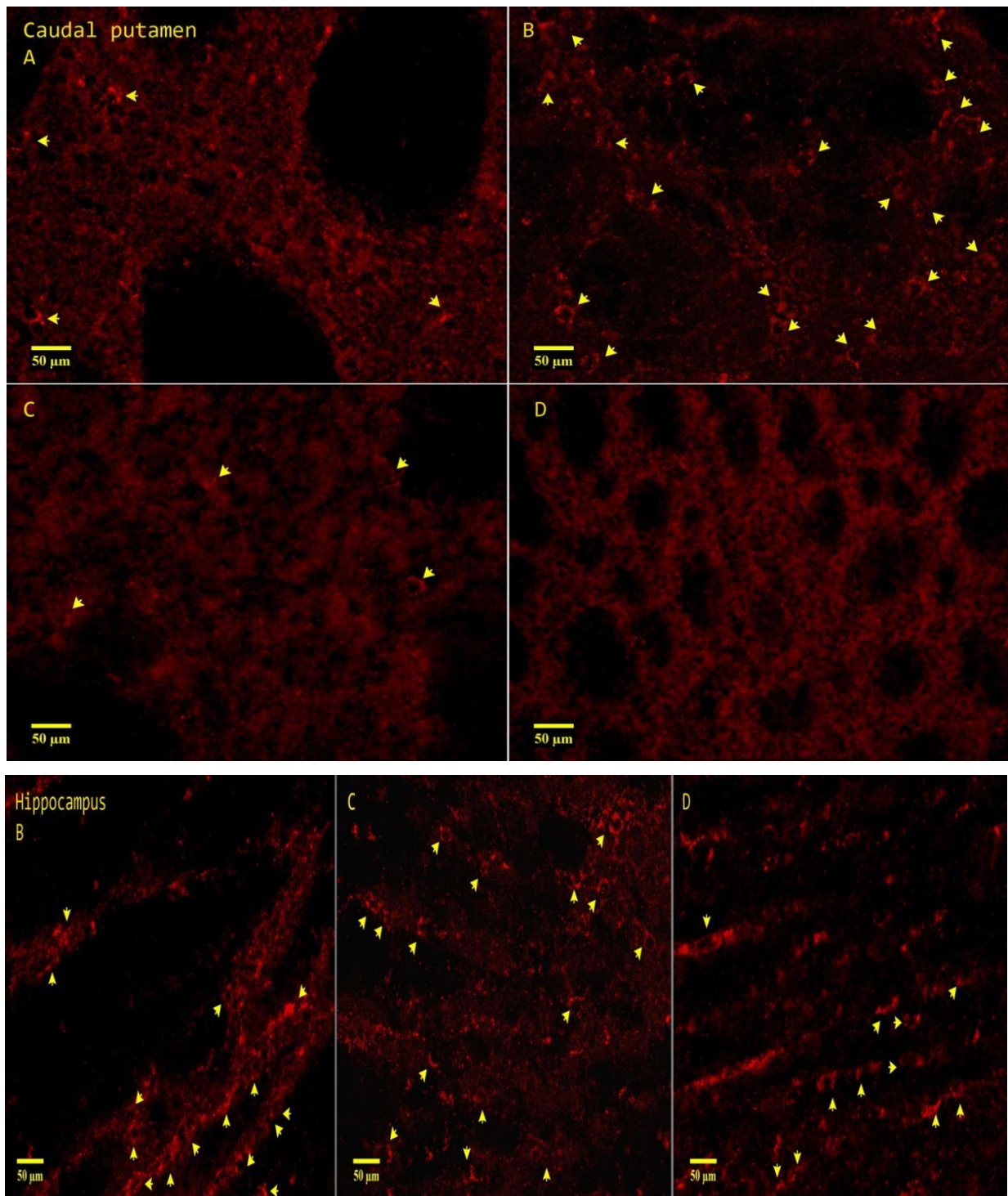
## 5. Détections des CD25 par immunofluorescence

Après montage des lames, les microsections ont été observées au microscope à épifluorescence sous excitation à lumière rouge (530nm). Des photographies ont été prises puis traitées sous le logiciel libre *ImageJ* afin d'améliorer le contraste. Les microsections ont été observées sous la lumière visible et des photographies ont été prises (Figure 31). Les images du marquage sont présentées dans la Figure 32 et regroupées selon la région cérébrale étudiée.



**Figure 31.** Observation microscopique des microsections sous lumière visible (Olympus CKX41, grossissement : 100X). A : Cortex moteur (CxM), B : Striatum (*Caudal putamen*: CPu, CC: corpus callosum), C : hippocampe (CA1, CA2 et CA3).





**Figure 32.** Immunodétection par fluorescence de l'expression des CD25 dans des microsections du cerveau des rats juvéniles stressés in utero. Les régions cérébrales étudiées sont : cortex préfrontal, cortex moteur M1, Striatum (*caudal putamen*) et hippocampe. Les résultats de l'observation microscopique (épifluorescence, grossissement : oculaire : 10x, objectif : 40x) sont groupés par région cérébrale et les groupes de rats, selon traitement, sont indiqués par lettre ; A : groupe témoin ; B : groupe de stress sonore ; C : groupe de stress de contention ; D : groupe de stress mixte ou combiné. (Olympus CKX41, grossissement 400x).

La détection des CD25 au niveau central par immunofluorescence a été suivie par une observation au microscope à épifluorescence (530nm) et un comptage de cellules marquées (cellules/champ microscopique) (**Tableau 4**). Cette technique d'immunohistochimie a été réalisée sur 3 échantillons provenant de chaque groupe de rats. Nos résultats révèlent que le groupes SS a montré une expression importante de CD25 dans le cortex préfrontal, le cortex moteur M1 et le striatum et l'hippocampe et ce en comparaison avec les microsections du témoin. Cependant, les microsections du groupe SC sont distinguées par une grande expression de CD25 au niveau de l'hippocampe, dont la concentration de cellules marquée est nettement plus élevée que celle observée dans les échantillons SS. Les microsections SM, quant à elles, ont connu une concentration médiane de cellules marquées et ce au niveau du cortex préfrontale, cortex moteur M1 en comparaison avec les groupes SS et SC. Par contre, les microsections SM ont montré présence très importante de cellules marquées, plus importante même que SS et SC, au niveau de l'hippocampe. Aucun marquage n'a été détecté dans le striatum des échantillons SM. Les résultats du comptage sont résumés dans le tableau suivant :

**Tableau 4.** Comptage des cellules marquées à l'anti CD25 dans différentes régions cérébrales. Le nombre de cellules est exprimé par : Cellule/champs optique. T : contrôle, SS : stress sonore, SC : stress de contention, SM : stress mixte. Le comptage a été fait sur 5 sections/rat, sur 3 rats de chaque groupe.

	<i>Cortex préfrontal</i>	<i>Cortex moteur M1</i>	<i>Striatum</i>	<i>Hippocampe</i>
<b>T</b>	2	1.66	2.66	-
<b>SS</b>	10.33	3.66	16	11
<b>SC</b>	1	0	2.33	15.33
<b>SM</b>	5.66	1	0	10.33

# **DISCUSSION GENERALE**

L'objectif de la présente étude était de déterminer dans quelle mesure un stress prénatal de type sonore et/ou de contention, appliqué individuellement, puisse impacter le développement neurocomportemental et physiologique de la descendance juvénile du Rat Wistar. Nous avons pu mettre en évidence les altérations touchant le comportement explorateur, les performances locomotrices et la faculté d'équilibration posturale des rats (Balance). En outre, une analyse des variations de certains paramètres biochimiques en l'occurrence hépatiques et lipidiques, a été faite dans le but d'estimer l'influence d'un évènement stressant, voire traumatisant, perçu pendant la « préhistoire » de l'individu, sur l'incidence des troubles physiologiques plus tard dans sa vie, et donc, évaluer le risque d'émergence des maladies organiques.

En étant en étroite relation avec le système nerveux central, le système immunitaire a été la troisième cible de nos investigations. En effet, nous avons tenté de cerner la part et la relation du système immunitaire dans l'apparition des altérations observées, par l'énumération des cellules immunitaires circulantes d'une part, et par l'évaluation de l'expression des IL2R au niveau du cerveau d'une autre part.

Les trois aspects étudiés dans ce travail, à savoir : comportement, biochimie et immunologie, ont également été analysés dans le cas d'une exposition mixte aux deux types de stress déjà appliqués séparément. La combinaison de nos deux modèles de stress utilisés simule chez le modèle animal, la multitude d'agents stressants qui coexistent dans notre environnement ambiant (stress au travail, pollution sonore, l'insécurité, élaboration d'une thèse...etc.).

En réalité, la notion du stress est couramment utilisée pour désigner une situation embarrassante, frustrante voire menaçante tel que les évènements négatifs de la vie (divorce, perte d'un emploi, déménagement, difficultés financières, burnout...etc.). Selye est considéré comme le père de la conversion de la notion de « stress » d'un terme populaire à un terme scientifique et médical. Il le décrit comme étant une contre-réaction non spécifique de l'organisme visant à réorganiser ses priorités énergétiques et restaurer l'équilibre qui est menacé par une agression extérieure [3]. Cette définition fut désormais nommée « Syndrome d'adaptation généralisée ». Depuis, plusieurs définitions, plus précises, ont été proposées et dans lesquelles les facteurs environnementaux et génétiques ont été pris en compte.

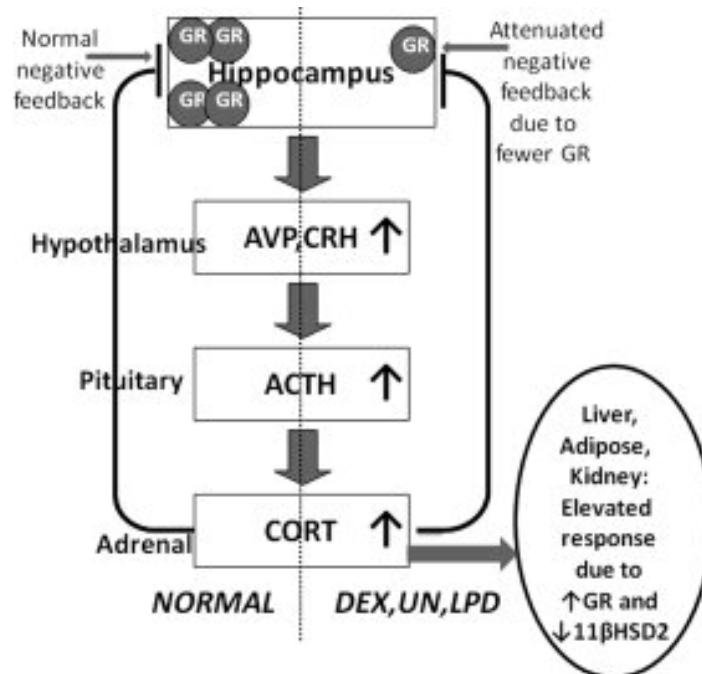
A titre indicatif, Chrousos et Gold en 1992 ont intégré l'importance du polymorphisme génétique, des altérations de l'expression des gènes et des facteurs environnementaux dans la réponse individuelle au stress [4].

Toutefois, entre le facteur environnemental et le facteur génétique, un facteur « maillon » semble intervenir comme interface d'action, via laquelle la ladite réponse, plus ou moins adaptative, pourrait être transgénérationnelle [10, 13, 16, 51]. Il s'agit là de l'épigénétique. En effet, plusieurs études antérieures ont montré qu'une exposition prénatale à un environnement stressant d'une manière chronique, impacte le neurodéveloppement de la progéniture par des mécanismes encore méconnus [6, 52]. La modification de l'expression génétique sous l'influence de cet environnement stressant pendant la gestation pourrait être une explication plausible aux changements comportementaux et physiologiques observés chez la descendance.

Parmi les principaux systèmes sollicités lors d'une exposition à un stress, et dont le dysfonctionnement entraîne d'autres, est bien l'axe HPA. En effet, le dosage de l'hormone adénocorticotrope dans les quatre groupes de rats a révélé que les traitements prénataux utilisés dans ce travail ont bel est bien induit une hausse de la concentration plasmatique basale de l'ACTH à l'adolescence qui reflète une hyperactivité basale de l'axe HPA. Nos résultats corroborent avec les conclusions de plusieurs travaux tels que ceux de Maccari [32] et ceux de Morley-Fletcher [34, 57, 58].

La perception d'un stimulus aversif par le cerveau conduit à l'activation de plusieurs mécanismes (**Figure 33**) dont le but est d'améliorer l'adaptation de l'organisme avec cette situation perçue comme dangereuse voire menaçante. Plusieurs structures cérébrales comme le Thalamus, amygdale, cortex préfrontal, noyau de Raphé, hypothalamus, hypophyse et d'autres, se mettent en jeu pour orchestrer la riposte neurophysiologique et comportementale à un tel stimulus [55, 56, 61]. Le cortex et le système limbique intègrent et analysent ces informations collectées et effectuent une comparaison entre le stress perçu et les expériences affectives passées, afin d'élaborer une réponse adaptée. Enfin, l'amygdale et l'hippocampe par l'intermédiaire de l'hypothalamus déclenche une réponse coordonnée. Il y a alors activation immédiate du système nerveux orthosympathique (neuro-végétatif) et du système neuroendocrinien (par les glandes surrénales). L'hypothalamus alors, carrefour des informations afférentes et les systèmes effecteurs, déclenche la sécrétion de l'ACTH hypophysaire par son facteur de sécrétion *corticotrope releasing factor* (CRF) libéré par le noyau paraventriculaire (NPV). L'ACTH est donc charriée dans le torrent sanguin jusqu'aux glandes surrénales où elle déclenche la synthèse et la libération des GC [62] qui induisent à leur tour, au niveau des tissus exprimant leurs récepteurs, une modification des priorités énergétiques et métaboliques. Cette modulation du métabolisme prépare le sujet à une réaction d'évitement ou de fuite. L'augmentation de la concentration plasmatique des GC exercent au niveau central un feedback

négatif grâce à leurs récepteurs centraux (GR) distribués majoritairement dans le système limbique [63].



**Figure 33.** L'axe HPA d'une progéniture normale (à gauche), et prénatalement stressée par un traitement à la dexaméthazone (DEX), sous-alimentation (*Underfeeding* : UN) ou un régime hypoprotéique (*Low Protein Diet* : LPD).

### 1. ACTH et Poids relatif des surrénales

Les concentrations plasmatiques sensiblement élevées de l'ACTH basale chez la descendance est considérée comme un effet majeur d'un stress prénatal, car des taux élevés et chroniques en ACTH mobilisent des sécrétions accrues et chroniques aussi en GC et MC. Ce déséquilibre serait à l'origine d'une perturbation physiologique à plusieurs niveaux tissulaires. Cependant, l'explication d'un tel désordre dans l'activité de l'axe HPA de la descendance semble susciter de plus en plus d'intérêt dans le concert scientifique sans pour autant arriver à apporter une explication unanime à cette question.

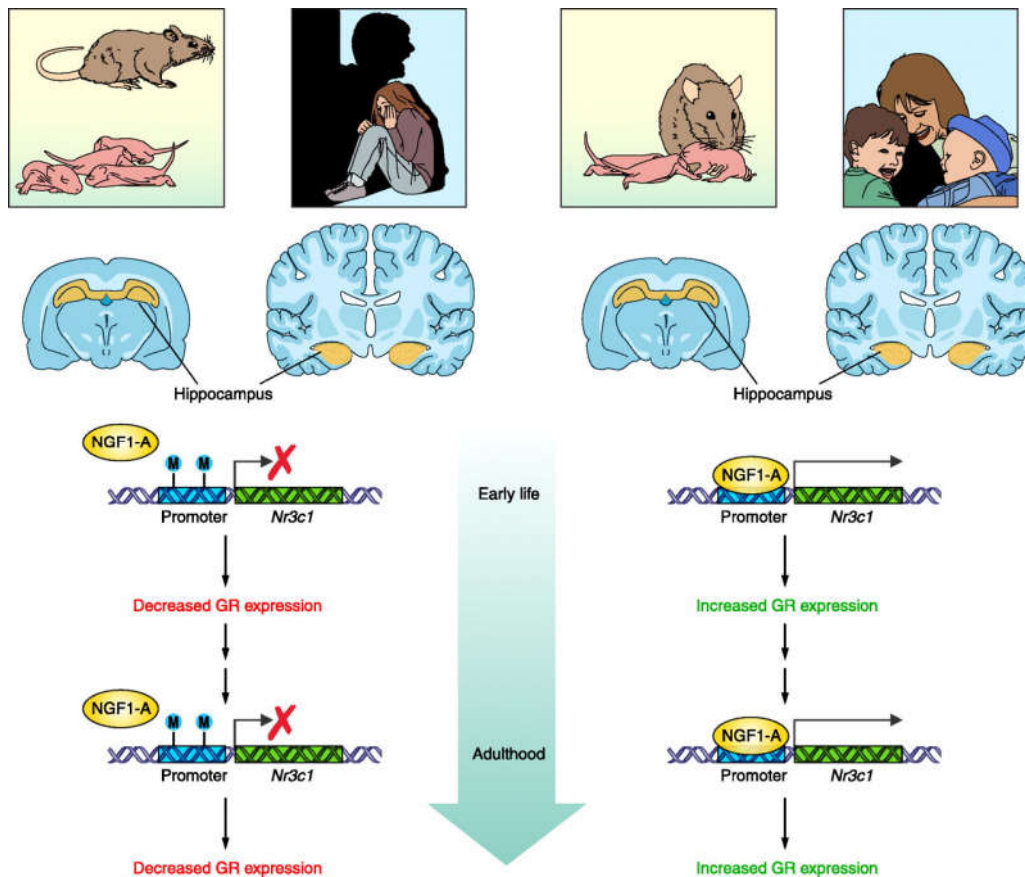
Un stress pendant la période de la conception pourrait exposer les fœtus à des taux élevés de glucocorticoïdes d'origine maternelle pouvant traverser la barrière hémato-placentaire et hémato-encéphalique [64]. Il a été déjà montré qu'une exposition aux GC maternels altère l'efficacité du rétrocontrôle des GC de la progéniture en diminuant l'expression génétique des GR au niveau de

l'hippocampe [65, 62] ce qui pourrait expliquer le feedback négatif défaillant des GC et donc l'hyperactivité de l'axe HPA [66].

De plus, il a été établi qu'un stress prénatal provoque une augmentation de l'expression des GR au niveau de l'amygdale, structure clé dans le contrôle des émotions en l'occurrence la peur et l'anxiété. Une telle surexpression des GR serait impliquée dans l'apparition de l'anxiété chez les rongeurs [67].

Plusieurs travaux ont réussi à démontrer que l'environnement prénatal n'est pas le seul facteur délimitant de l'expression des GR. En effet, la revue bibliographique faite par Elizabeth Cottrel et Seckl [66] au sujet de la programmation épigénétique des GR, a bien résumé les principales conclusions de plusieurs travaux faits dans ce sens. Liu et al. [68] ont pu mettre en évidence que des rats exposés à des soins maternels intenses tels que léchage et toilettage (*High licking and Grooming : High-LG*) ont connu une augmentation de l'ARNm GR et une réponse HPA réduite à l'âge adulte, comparativement au rats ayant été exposés à peu de soins maternels (*low-LG*). Ceci dit que le taux d'expression des GR est directement corrélé aux soins maternels. Ces résultats ont été confirmés plus tard par Weaver [69] en révélant qu'il n'existe aucune différence dans le degré d'expression des gènes à JPN 1 entre les deux groupes de rats : *High-LG* et *Low-LG*. Ce n'est qu'à partir de JPN6 que la différence d'expression génétique s'est manifestée. Cette augmentation d'expression serait médiée par l'activation des Voies sérotoninergiques (5-HT) en réponse à la stimulation tactile (*Heandling* ou *LG* maternel) [70] (**Figure 34**).

De ces données nous pouvons suggérer que les observations ici faites peuvent découler du comportement maternel post-natal. Il serait possible que les femelles SS aient un comportement maternel altéré (soins maternels) ce qui a probablement inhibé une éventuelle réparation des altérations observées, contrairement à la progéniture SC et SM qui a du probablement bénéficié de plus de soins maternel. Une étude du comportement maternel est nécessaire pour vérifier cette possibilité.



**Figure 34.** Effets des soins maternels sur la programmation épigénétique des gènes codant pour les récepteurs des glucocorticoïdes (GR). A gauche : *Low-LG* chez le Rat et un abus parental chez l'Homme induisent une méthylation de l'ADN dans la région du promoteur des GR qui altère la fixation du facteur transcriptionnel : *Nerve-Growth Factor 1-A* (NGF1-A) et donc bloque la transcription du gène *nuclear receptor 3 group C member 1* (Nr3c1). A droite : *High-LG* chez le rat et des soins maternels intenses chez l'Homme réduisent la méthylation d'ADN ce qui permet la fixation du NGF1-A sur son promoteur et donc améliore la transcription du Nr3c1 qui code pour les GR [71].

En guise de marqueur supplémentaire de l'activité de l'axe HPA, le poids relatif des glandes surrénales appuie les résultats de la concentration basale de l'ACTH enregistrés. Dans la littérature, une hyperactivité chronique de l'axe HPA est associée d'une hyperplasie des glandes surrénales [72]. En effet, la sécrétion chronique d'ACTH à des taux élevés exerce au niveau des surrénales une hyperstimulation de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse des catécholamines [69, 70] d'où l'hypertrophie observée dans nos trois groupes de stress prénatal.

La nature et l'intensité de l'agent stressant sont considérées comme facteur important qui détermine le degré des altérations physiologiques et comportementales [12, 71]. A la différence du stress de contention, le stress sonore prénatal semble pouvoir générer des taux d'ACTH

sensiblement plus élevés que ceux générés par le stress de contention. Des travaux précédents ont montré que ces deux modèles de stress, appliqués à des intensité et/ou durée plus importantes, aient provoqué une hausse de la concentration plasmatique de l'ACTH et de la corticostérone [32, 72–74]. Cependant, nos résultats révèlent qu'il n'existe pas une proportionnalité entre l'intensité du stress et les troubles observés dans le cas du groupe SM. En effet, les concentrations plasmatiques d'ACTH ainsi que le poids relatif des surrénales enregistrés dans le groupe ayant été exposé in utero à deux types de stress différents (son + contention) suggèrent que la multiplication des sources de stress n'induit pas l'amplification des effets. Ceci prouve à dire que les individus exposés in utero à plusieurs événements stressants auraient développé soit une meilleure adaptation, soit leurs mères auraient réagi à ce stress mixte avec moins d'emballement et /ou un feedback efficace de l'axe HPA, comparativement aux mères exposées aux stressés séparément appliqués.

Il existe naturellement au niveau de la barrière hématoplacentaire, une enzyme pouvant empêcher le passage des GC maternels vers le fœtus. En effet, la 11 $\beta$ -Hydroxy-stéroïde-déshydrogenase Type 2 (11 $\beta$  HSD2) convertit les GC maternels actifs en métabolites inactifs : déshydro-glucocorticoïdes [34, 75]. Seulement un taux de 10 à 20% du cortisol maternel peut traverser cette barrière [80]. Toutefois, en condition de stress, le taux des GC maternels qui passe au compartiment fœtal est plus élevé et peut influencer à long terme son neurodéveloppement [81]. K.Jensen Peña et al. [56] ont montré dans leurs travaux qu'un stress prénatal est associé à une baisse d'expression de la 11 $\beta$  HSD2 et une augmentation d'expression de l'ADN méthyltransférase dans le placenta et dans le cortex fœtal. Ses résultats proposent la méthylation d'ADN comme mécanisme épigénétique impliqué dans l'altération de la fonction catalytique de la 11 $\beta$  HSD2.

Il est à noter que les glucocorticoïdes exercent leurs actions essentiellement par des effets génomiques en agissant sur la transcription de l'ADN et la régulation post-transcriptionnelle de l'ARN. Les récepteurs aux GC sont exprimés dans la quasi totalité des cellules. Leur récepteurs sont présents au niveau du cytoplasme à l'état inactif, liés à un complexe protéique comprenant des *heat shock protein (HSP)* ou chaperonine: Deux sous-unités HSP90, HSP70, HSP56 et HSP26. La fixation des GC sur les GR induit la libération des chaperonines de ces récepteurs permettant ainsi la translocation du complexe GC-GR vers le noyau où il va agir sur la transcription de l'ADN de différentes manières :

- Interaction inhibitrice des GC-GR avec l'ADN en se fixant sur leurs ligands spécifiques appelés *Glucocorticoids response element* (GRE),
- Interaction inhibitrice des GC-GR avec les facteurs de transcription,
- Interaction inhibitrice des GC-GR avec d'autres constituants du complexe transcriptionnel.

## 2. Test du champ ouvert et de la croix surélevée

La batterie de tests comportementaux utilisés dans notre étude nous a permis d'évaluer l'exploration et l'activité locomotrice de la progéniture. Nos résultats rapportent des altérations dans le comportement locomoteur et explorateur dans les trois groupes de stress prénatal. Nos observations s'ajoutent à d'autres travaux [9,77] qui ont aussi confirmé que le stress prénatal affecte le comportement motivationnel du Rat. Il est admis que la dopamine est un neurotransmetteur qui joue un rôle crucial dans le mouvement et la locomotion [83]. D'ailleurs, plusieurs études ont conclu que la locomotion du Rat dans l'OF augmente en augmentant le nombre de récepteurs dopaminergiques stimulés [84]. Il a été également noté qu'une déplétion de la concentration de dopamine s'accompagne d'une baisse de l'activité locomotrice [85]. De même, le trouble de la signalisation dopaminergique semble être dû à une défaillance de signalisation postsynaptique ; Slotkin et ses coéquipiers [86] ont pu détecter au niveau du cortex et de l'hippocampe de rats stressés prénatalement, une augmentation de la concentration synaptique de dopamine associée à une augmentation de son turnover (recapture présynaptique). A la lumière de ses résultats, ils proposent comme explication : l'altération de la structure des récepteurs à dopamine qui paraissent incapables de fixer la dopamine induisant ainsi son accumulation dans l'espace synaptique, et donc sa recapture. L'exposition prénatale à des taux élevés de glucocorticoïdes pourrait moduler la densité et la distribution des neurones dopaminergiques et altérer son fonctionnement par des mécanismes qui restent jusqu'à lors méconnus [87]. Plusieurs études ont montré que la réduction de l'exploration serait due à un dysfonctionnement du système sérotoninergique [88]. Dans le même contexte, Lesch et ses collègues ont rapporté que le promoteur du gène qui code pour l'expression du transporteur de la sérotonine (5-HT) peut être l'objet d'un polymorphisme [89] touchant une allèle de 43 paires de bases (forme longue) qui est connu pour être à l'origine d'une expression importante de 5-HT. Cependant, lorsque la forme courte remplace la forme longue de l'allèle, l'expression diminue [90]. Cette dernière forme est également associée à l'apparition de troubles dépressifs [91].

En effet, les observations collectées à l'issue du test EPM indiquent que les trois groupes de stress prénatal ont exprimé un comportement anxieux et ce en passant plus de temps dans les bras fermés que dans les bras ouverts [92], à l'exception des rats SC dont le degré d'anxiété enregistré n'a pas été statistiquement significatif. De plus, le temps passé dans les coins enregistré dans l'OF est également considéré comme indicateur du degré d'anxiété chez le Rat [42]. Encore une fois, nos résultats concordent avec d'autres [14, 88] rapportant que le stress prénatal induit chez la progéniture un état anxieux à long terme. Curieusement, et contrairement aux autres paramètres, l'exposition prénatale à un stress mixte a induit un degré élevé d'anxiété par rapport aux deux autres groupes de stress. Bien que les rats SM n'aient pas connu une activité corticotrope aussi importante que celle observée chez les rats SS et SC, l'état anxieux semble être plus prononcé que ces deux derniers. Globalement, l'apparition d'un comportement anxieux est fortement corrélée à un dysfonctionnement dans le système sérotoninergique notamment par ses afférences qui projettent au sein du système limbique (hippocampe, amygdale, ... etc.). Il a été démontré antérieurement chez des individus dépressifs que l'expression des récepteurs 5-HT principalement de type A1 et A2 est inhibée, et accompagnée de : une baisse d'expression des récepteurs de la CRF, une augmentation de la concentration en ARNm de CRF dans NPV, augmentation de la concentration en ARNm de la proopiomelanocortine (POMC) hypophysaire (précurseur d'ACTH) et une hyperplasie des surrénales [72]. Une autre étude a montré que l'utilisation d'un agoniste des 5-HT<sub>1A</sub> a estompé le comportement anxieux observé à l'issue de l'EPM [94]. Toutes ces données appuient et confirment l'implication du système sérotoninergique dans l'émergence d'un état anxieux.

Nos observations montrent encore une fois que les altérations de la motivation ici-soulevées sont plus prononcées dans le groupe de stress sonore, et moins marquées dans le groupe du stress mixte. Sous la lumière de ces résultats, nous pouvons conclure que la nature et du stress affecte sélectivement et différemment les régions cérébrales ce qui se manifeste par des degrés différents d'altérations comportementales et même physiologiques. Cette conclusion est en accord avec les travaux de Weinstock et ses collègues [14].

### **3. Test du mât arrêté**

Des travaux scientifiques ont montré qu'une exposition à une ambiance sonore affecte des régions non auditives dans le cerveau [95] en l'occurrence l'amygdale et l'hippocampe qui reçoivent des entrées neuronales directes et indirectes du système auditif central [91, 92]. Maladies cardiovasculaires, dyslipidémie, hyperglycémie [98], trouble de sommeil [99],

altération des performances cognitives [100] et beaucoup d'autres troubles sont générés par l'exposition au bruit environnemental [13]. Les résultats ici présentés montrent l'apparition de troubles de locomotion chez les rats prénatalement stressés qui sont plus marqués chez les rats du groupe SS. Nous avons alors décidé d'étendre nos investigations en ciblant la coordination motrice des rats par l'utilisation d'un test plus spécifique à la coordination motrice, qui est le test du mât arrêté.

L'évaluation de la coordination motrice des rats a révélé une altération sévère de la capacité des rats SS à maintenir leurs corps en équilibre afin de traverser la barre du mât. Les rats du stress mixte ont également manifesté un trouble de la balance par rapport au groupe témoin, mais qui reste notablement moins important que celui des rats du stress sonore. Par contre, les rats SC n'ont manifesté aucune altération. Nos résultats ont tendance à soutenir l'idée de l'atténuation des effets des stressseurs combinés tels que avancé dans l'hypothèse d'Evans. En effet, rappelant qu'à selon Evans [32] le stress mixte peut induire des effets soit par multiplication ou atténuation. En réalité, peu de travaux ont abordé les effets de synergie d'addition ou d'exclusion de stress différents. Il semble que dans le cas de nos paradigmes de stress, les effets ont été atténués. Les facultés adaptatives des mères exposées au stress mixte ainsi que celles de leur progéniture pourraient être à l'origine de telles réparations. En effet, l'exposition des femelles gestantes au stress sonore suivi par le stress de contention de façon chronique aurait éventuellement développé chez elles une habitude au premier stress (sonore) qui s'est révélé être la composante la plus stressante par rapport à la contention. Campbel et son équipe ont observé un comportement adaptatif chez des rats exposés à de multiples stress [101].

Nos résultats n'ont pas fournies assez d'information pour se prononcer sur les éventuelles lésions que peut engendrer un stress prénatal sur le système vestibulaire. Cependant, des altérations ont été rapportées sur le système vestibulaire ; elles se manifeste par une oscillopsie [97, 98] et des troubles anxieux [77]. Effectivement, le niveau d'anxiété, enregistré dans EPM, était très marqué dans les rats SS et SM plus que les rats de SC.

En outre, le striatum, une autre région du cerveau, a également été impliqué dans l'activité sensorimotrice et le contrôle des processus motivationnel et émotionnel liés à l'acte moteur [30]. Pisa et al. [44, 99] rapportent que la lésion locale dans le striatum latéral a baissé la vitesse de déplacement et altéré l'équilibration postural sur le mât. Cet effet a été également vérifié dans les travaux de Perrot [105]. En se référant à toutes ces données rapportées et selon nos résultats, nous pouvons suggérer que la perturbation de l'équilibre peut être générée par la modification

locale de certaines régions du cerveau telles que le striatum pendant la vie intra-utérine ou altération de certaines structures spécifiques à cette fonction telles que le système vestibulaire. D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer les régions cérébrales spécifiques impliquées dans la réduction du contrôle de l'équilibre, liées au stress sonore prénatal. Cette altération pourrait être médiée par les glucocorticoïdes maternels qui ont un accès libre à l'ensemble du système nerveux du fœtus lorsque la restriction du passage des GC maternels au fœtus est inhibée.

Cependant, le résultat le plus intéressant ici est le très faible temps mis par les rat SM pour traverser le BW, et qui est très proche de la valeur du témoin. Nous pouvons suggérer que l'exposition au bruit suivie par la contention prémunit l'altération de l'équilibre observée uniquement chez les rats du stress sonore. Aucune étude antérieure n'a vérifié l'impact d'une telle combinaison sur le contrôle de l'équilibre.

Il est à noter que ce dispositif est connu pour être anxiogène pour les rongeurs étant donné que ce dernier sera placé sur une barre étroite et surélevée du sol. Pour cette raison, le paramètre du temps mis pour traverser la barre pourrait être un indice de l'état émotionnel du rat qui a naturellement une phobie des endroits élevés. Cette peur des hauteurs, qui est déjà accentuée par l'état émotionnel altéré par le stress prénatal, serait probablement à l'origine du temps prolongé enregistré dans le groupe SM, et qui n'est pas en harmonie avec le nombre de faux-pas du même groupe. Cette disparité écarte la possibilité d'une éventuelle altération de la coordination motrice des rats SM et appuie les résultats de l'EPM qui ont montré un degré d'anxiété prononcé.

#### **4. Test olfactif**

Vu l'importance du système olfactif dans la communication chez les rongeurs, l'évaluation des capacités olfactives ont été évaluées. L'olfaction est un sens qui joue un rôle crucial dans les interactions sociales, la perception de l'environnement, la détection d'un danger et surtout dans la quête de la nourriture ou d'un partenaire sexuel. Un trouble dans le bon fonctionnement de ce système de manière transgénérationnelle, pourrait même aller jusqu'à mettre en péril l'existence de l'espèce.

Le test de la reconnaissance de l'odeur maternel (ou du nid) a révélé des résultats surprenant quant à l'effet d'une exposition prénatale chronique à un stimulus sonore sur les performances de l'odorat du Rat. En effet, nous avons observé à l'issue du test olfactif que 78% des rats du stress sonore ont échoué dans la reconnaissance du nid et de l'odeur de leurs mères, contre seulement

22% des rats du stress mixte comparativement au lot témoin. Les rats SC ont tous réussi à repérer le nid du groupe.

Des rapports antérieurs indiquaient que des interactions entre les glucocorticoïdes (GC) et les systèmes dopaminergiques sont à l'origine de nombreuses maladies humaines [106]. D'ailleurs, une hypothèse a été établie dans laquelle les systèmes neuronaux dopaminergiques limbiques seraient impliqués dans certains des effets des GC au niveau du SNC [107]. De plus, il semble que le stress induit une modulation du système dopaminergique (DA) en modifiant l'expression de ses récepteurs qui à son tour, paraît sensible à la concentration extracellulaire de DA. Ces constatations ont été vérifiées dans les travaux de Rasheed et al. [108] signalant que la densité des récepteurs de la DA, spécialement le sous-type D1, a été fortement perturbée après exposition au stress chronique et sans qu'il y ait un effet significatif sur la densité D2 dans plusieurs régions du cerveau.

En effet, les récepteurs D1 semblent avoir un rôle important non seulement dans la mémoire épisodique, l'émotion et la cognition [107], mais aussi dans la modulation du traitement de l'information odorante acheminée par les récepteurs olfactifs [83]. En effet, l'activation des récepteurs D1 ou le blocage des récepteurs D2 ont tous deux montré une amélioration dans la discrimination entre deux odeurs semblables, tandis que le blocage de D1 ou l'activation de D2 altèrent la discrimination des odeurs [109].

D'autre part, l'expression des GR a été détectée dans la muqueuse olfactive, plus spécifiquement dans les neurones sensoriels olfactifs [110] suggérant que ces cellules pourraient être sensibles à l'action des glucocorticoïdes. En tenant compte de la période d'apparition du D1 chez le fœtus du Rat (de 18 à 21 jours de gestation) [111], il serait possible que les glucocorticoïdes maternels altèrent l'expression normale du sous-type D1 dans le bulbe olfactif fœtal et, par conséquent, entraînent une altération de la discrimination olfactive à l'âge juvénile. Bien qu'un taux élevé de la concentration plasmatique basale de l'ACTH ait été détectée dans les trois groupes de stress, la défaillance de discrimination olfactive n'a été détectée que dans le groupe SS. Cette observation appuie une seconde fois l'idée de la sélectivité d'interaction des GC avec les régions cérébrales, en fonction de la nature du stress [108].

Une autre explication à ces altérations est potentiellement plausible et qui repose sur le statut pro inflammatoire promu par le stress chronique [107, 108]. En fait, la dépression a été décrite comme une maladie inflammatoire [109, 110]. Chez la femelle gestante, elle peut favoriser la neuroinflammation dans le compartiment fœtal [116] via les cytokines pro-inflammatoires

maternelles [117]. Le rôle de l'inflammation dans l'apparition de tels troubles sera discuté dans la section « Immunohistochimie ».

## 5. Paramètres physiologiques biochimiques

Chez les rongeurs, l'exposition prénatale à un environnement stressant perturbe le bon fonctionnement cardiovasculaire et celui du système nerveux central de la progéniture [118]. Le rôle crucial de l'axe HPA, mis en cause dans l'émergence de ces troubles, a été longtemps au centre d'intérêt des chercheurs. Par contre, les changements métaboliques qui accompagnent l'altération de l'axe HPA a suscité très peu d'intérêt [118].

Rappelons que le stress sonore a engendré une augmentation du poids chez les rats alors que les stress de contention et mixte ont induit une relative baisse par rapport au témoin.

Dans une étude faite sur l'Homme, il a été démontré que les enfants nés de mères ayant vécu un stress mental sévère tel que la perte d'un proche parent, avaient un indice de masse corporelle significativement élevé à partir de 10 ans par rapport à des enfants témoins [119]. D'autres études faites sur des modèles expérimentaux ont révélé par contre une association entre le stress prénatal et le faible poids corporel à la naissance (JPN 2) et persistant jusqu'au JPN 60 [11]. Nos résultats concordent en partie avec ceux de cette dernière étude. En effet, nous avons constaté que seuls les rats du stress sonore avaient présenté un faible poids corporel à la naissance par rapport aux témoins, avec une compensation pondérale à partir de JPN7. La prise pondérale continue à augmenter jusqu'au JPN 30. Le faible poids corporel à la naissance est probablement dû aux effets cataboliques des glucocorticoïdes en bloquant l'action des facteurs de croissance tels que *l'insulin growth like factor* [118]. Ce ralentissement de croissance qui serait dû à une surexposition aux GC maternels est accompagné d'une surexpression des gènes codant pour les protéines du métabolisme lipidique. En effet, Maeyama et al. [118] ont détecté une élévation significative de l'expression des *peroxisom-proliférateur activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ) chez une progéniture âgée de 37 jours et qui a été exposée in utero à un stress chronique. L'expression de PPAR $\gamma$ , gène codant pour l'accumulation des lipides, est associée à la régulation d'expression de la 11  $\beta$  hydroxy-stéroïde déshydrogénase de type 1 (11 $\beta$ -HSD 1), enzyme responsable de la conversion du GC inactifs en GC actifs. Une telle modification du PPAR $\gamma$  est probablement une riposte adaptative précoce de l'organisme au retard de la croissance ralenti par l'excès des GC, favorisant ainsi l'accumulation des lipides, d'où l'apparition d'un surpoids dans le groupe SS. A la différence de ces derniers, les rats SC n'ont connu ni poids faible à la naissance ni un surpoids plus tard comparativement au témoin.

Le résultat le plus marquant dans notre travail est sans doute l'évolution pondérale observée dans le groupe du stress mixte. Bien que les rats de ce dernier groupe aient été exposés in utero à un stress sonore, les manifestations physiologiques postnatales des rats SM n'ont rien de commun avec celle du stress sonore. Ceci consolide l'hypothèse déjà énoncée que dans le cas du stress mixte (contention + son) une adaptation physiologique s'installe, ou probablement les altérations induites se manifesteront plus tard dans la vie de l'individu.

## **6. Glycémie et dyslipidémie**

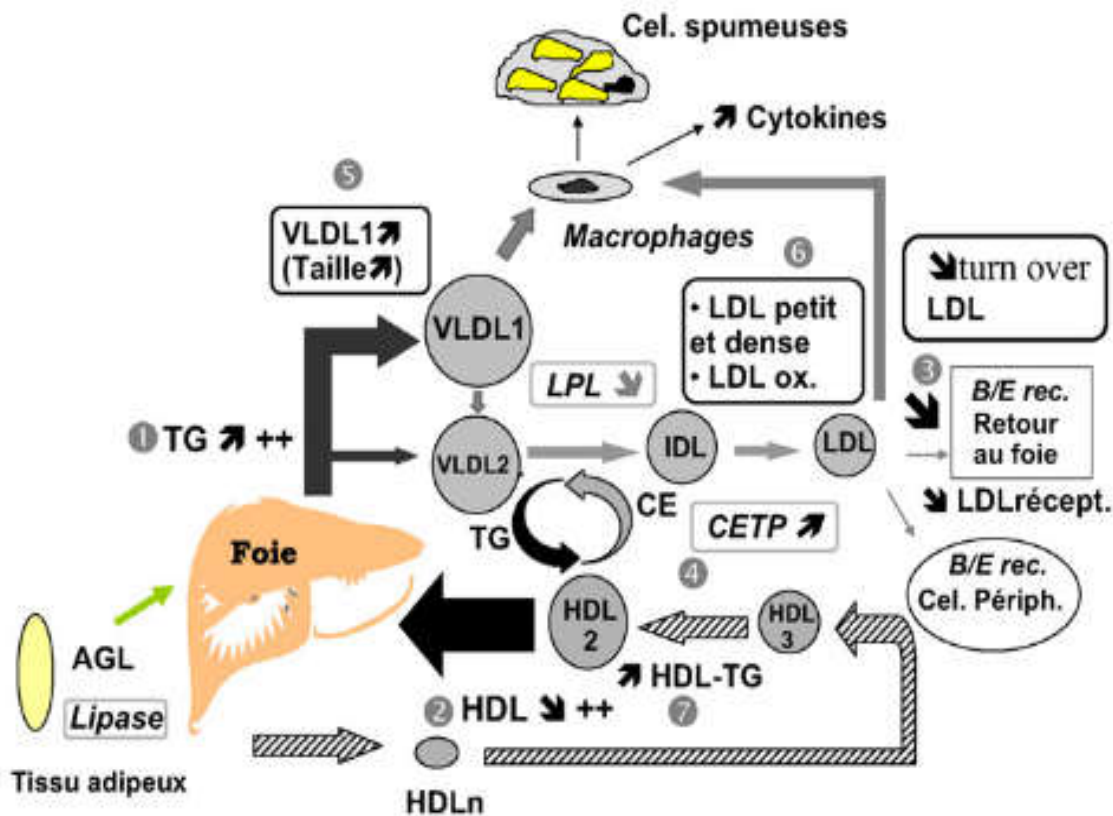
Les rats SS ont présenté une augmentation de la glycémie et manifesté une tendance à développer une hyper glycémie à jeun. La glycémie des deux autres groupes était comparable aux témoins.

L'explication la plus probable est que le stress sonore augmente le passage des GC à travers la barrière hémato-fœtale. En effet, l'accès incontrôlé des GC au compartiment fœtal peut perturber des mécanismes métaboliques importants tels que le métabolisme glucidique et lipidique [55]. En plus, dans leur action épigénétique, les GC maternels sont capables d'induire des désordres métaboliques chez la descendance ; Nyrienda et al. ont pu mettre en évidence l'influence des glucocorticoïdes sur l'expression hépatique de la phosphoenol-pyruvate carboxy kinase (PEPCK) qui catalyse la transformation de l'oxaloacétate en phosphoenol pyruvate (PEP), une réaction clé dans la néoglucogenèse. Ils ont montré que l'exposition prénatale à la dexaméthazone, analogue structural de la corticostérone, a provoqué une élévation de la concentration et de l'activité hépatique de la PEPCK en plus d'une surexpression de leurs récepteurs hépatiques, signe d'une hypersensibilité hépatique aux GC [120]. De même, cette surexpression des GR a été également détectée dans le tissu adipeux abdominal, ceci contribuerait à la résistance à l'insuline dans le foie et le tissu adipeux viscéral [55]. Une activité anormale de la PEPCK en plus de l'altération de l'action suppressive de l'insuline débouche sur une hyperglycémie persistante ce qui concorde avec notre résultat enregistré dans le groupe du stress sonore.

L'hyperglycémie apparait associée aux manifestations métaboliques suivantes : surpoids (cas des rats SS), hypertriglycéridémie, hyper LDL-cholestérolémie et hypo HDL-cholestérolémie, dans les différents groupes. Ces variations physiologiques et biochimiques sont caractéristiques du syndrome métabolique, décrit pour la première fois par Reaven 1988 [121]. L'obésité abdominale et l'insensibilité périphérique à l'action de l'insuline sont considérées comme facteurs centraux impliqués dans la survenue du syndrome métabolique. La résistance à

l'insuline apparaît lors d'une défaillance de signalisation intracellulaire (phosphorylation antagoniste des récepteurs de l'insuline : *Insulin Receptor Substrat : IRS*) suite à laquelle la transmission du signal métabolique de l'hormone est bloquée. La cellule musculaire devient résistante à l'insuline et ne permet plus l'entrée du glucose, l'hépatocyte produit du glucose en excès et baisse de l'activité de la lipoprotéine lipase (LPL) périphérique conduisant à la prolongation du temps de résidence des LDL dans le plasma.

La résistance à l'insuline du tissu adipeux diminue l'activité de la LPL entraînant un ralentissement de l'épuration des lipoprotéines riches en triglycérides (Tg). Ce maintien des lipoprotéines dans le plasma favorise les échanges de Tg depuis les VLDL vers des HDL et LDL. L'augmentation du pool des lipoprotéines riches en Tg (telles les VLDL), observée dans le diabète de type 2, stimule l'activité de la cholesteryl ester transfer protein (CETP) favorisant ainsi le transfert des Tg des lipoprotéines riches en triglycérides vers les LDL, donnant ainsi naissance à ces LDL petites et denses enrichies en triglycérides. (**Figure 35**).



**Figure 35** : Principales anomalies lipidiques au cours d’une résistance à l’insuline et du syndrome métabolique. VLDL : Very Low Density Lipoprotein ; IDL : Intermediate Density Lipoprotein, LDL : Low Density Lipoprotein ; HDL : High Density Lipoprotein ; LPL : lipoprotéine lipase ; HL : hépatique lipase ; CETP : Cholesteryl ester Transfer protein ; LCAT : lecithin-cholesterol acyltransferase ; AGL : acides gras libres ; LRP : LDL-receptor related protein ; B/E rec. : récepteur B/E (LDL récepteur) ; ABCA1 : ATP binding cassette transporteur A1 ; TG : triglycérides. 1: hypertriglycéridémie (augmentation de la production des VLDL, diminution du catabolisme des lipoprotéines riches en TG (par réduction d’activité de la LPL) ; 2: diminution du HDL-cholestérol (par augmentation du catabolisme des HDL) ; 3: ralentissement du turn over des LDL (diminution des récepteurs LDL) ; 4: augmentation de l’activité CETP (transfert accru de triglycérides des lipoprotéines riches en TG vers les LDL et HDL) ; 5: augmentation de la production de VLDL de grande taille (VLDL1), captés de façon préférentielle par les macrophages ; 6 : augmentation des LDL petites et denses (riches en TG) et des LDL oxydés, captés de façon préférentielle par les macrophages ; 7: augmentation du contenu en TG des HDL [122].

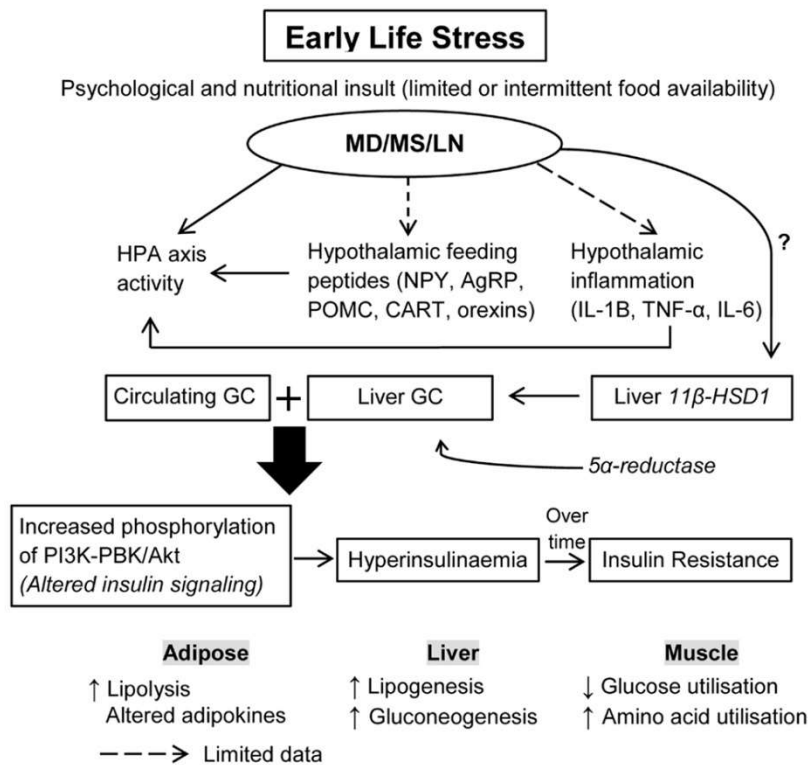
le ralentissement du catabolisme des LDL, c’est-à-dire une augmentation de leur temps de résidence plasmatique, susceptible de les rendre plus athérogènes, semble être lié à une réduction du nombre des récepteurs LDL, comme cela a été montré in vivo chez des patients souffrant d’un diabète type 2 [123]. Les LDL en circulation finissent par être phagocytés par les macrophages,

et ces derniers se transforment en cellules spumeuses qui s'infiltrant entre l'intima et la média des vaisseaux sanguins, pour former la pierre d'assise d'une plaque d'athérome.

D'autre part, les HDL enrichis en TG deviennent d'excellent substrat pour la lipase hépatique avec pour conséquence, l'accroissement de leur métabolisme [122].

Quant à l'aspect épigénétique, à l'origine de ces désordres métaboliques et apparaissant éventuellement après une surexposition prénatale aux GC, il faut rappeler l'existence d'un syndrome de Cushing qui a les mêmes manifestations physiopathologiques que le syndrome métabolique à la seule exception qu'il présente des taux plasmatiques élevés en GC. La distinction entre ces deux syndromes a été établie suite à la découverte de l'augmentation d'activation intracellulaire des GC au niveau des adipocytes [124]. Cette activation est assurée par l'enzyme  $11\beta$ -HSD type 1 et comme ces cellules expriment un grand nombre de récepteurs au cortisol (corticostérone), ce dernier peut donc agir de façon autocrine et favoriser l'hypertrophie des adipocytes viscérales [125] ainsi que la lipolyse locale qui aboutit par la libération des AG dans la circulation sanguine [121].

Probablement, l'augmentation des GC activés au niveau adypocutaire serait enclenché par la modulation prénatale de l'expression des gènes codant pour la  $11\beta$  hydroxy stéroïde déshydrogénase de type 1 ( $11\beta$ -HSD 1) [66]. Cette hypothèse d'un syndrome de Cushing du tissu adipeux viscéral a été illustrée dans des modèles animaux surexprimant la  $11\beta$ -HSD 1, cela a abouti à un vrai syndrome métabolique (**Figure 36**) de la souris associant à l'obésité abdominale, la dyslipidémie, HTA, les troubles du métabolisme glucidique, la stéatose hépatique [121].



**Figure 36 :** Effets des événements stressant dans la vie précoce de l'individu sur le métabolisme énergétique. L'excès circulant en glucocorticoïdes altère la signalisation insulinique provoquant une hyperinsulinémie et une insulino-résistance. *MD* : *maternal deprivation*; *MS* : *maternal separation*; *LN* : *limited nesting material*; *GC* : *glucocorticoids*; *TNF- $\alpha$*  : *tumor necrosis factor alpha*; *IL-6* : *interleukin 6*; *IL-1 $\beta$*  : *interleukin-1 beta*; *11 $\beta$ -HSD1* : *11-beta hydroxysteroid dehydrogenase* [126].

## 7. Cholestérolémie

Le cholestérol est un élément essentiel du système nerveux central (SNC), indispensable pour la stabilité de la membrane cellulaire et le bon déroulement de la neurotransmission. En effet sa présence dans la membrane cellulaire confère à cette dernière une bonne rigidité permettant la stabilité des récepteurs. Il est également connu pour être le précurseur des hormones stéroïdiennes (Glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes et les stéroïdes sexuels). D'ailleurs, l'ACTH a pour principal effet la stimulation des récepteurs surrénaliens qui captent le cholestérol sanguin et l'orientent vers la synthèse des hormones stéroïdiennes (**figure 37**). L'activation de l'axe HPA, sous l'action de l'ACTH, déclenche la synthèse des GC proportionnellement au degré de stimulation. L'hyperactivité de l'axe HPA, avec un feedback peu efficace, induit une capture accrue du cholestérol sanguin [127]. Ce mécanisme pourrait être la cause de la faible concentration plasmatique en cholestérol accompagnant généralement les

troubles de l'humeur et la dépression. Récemment, plusieurs études cliniques ont pu établir un lien entre la dépression, l'agressivité et le suicide avec la faible concentration plasmatique en cholestérol [124, 125].

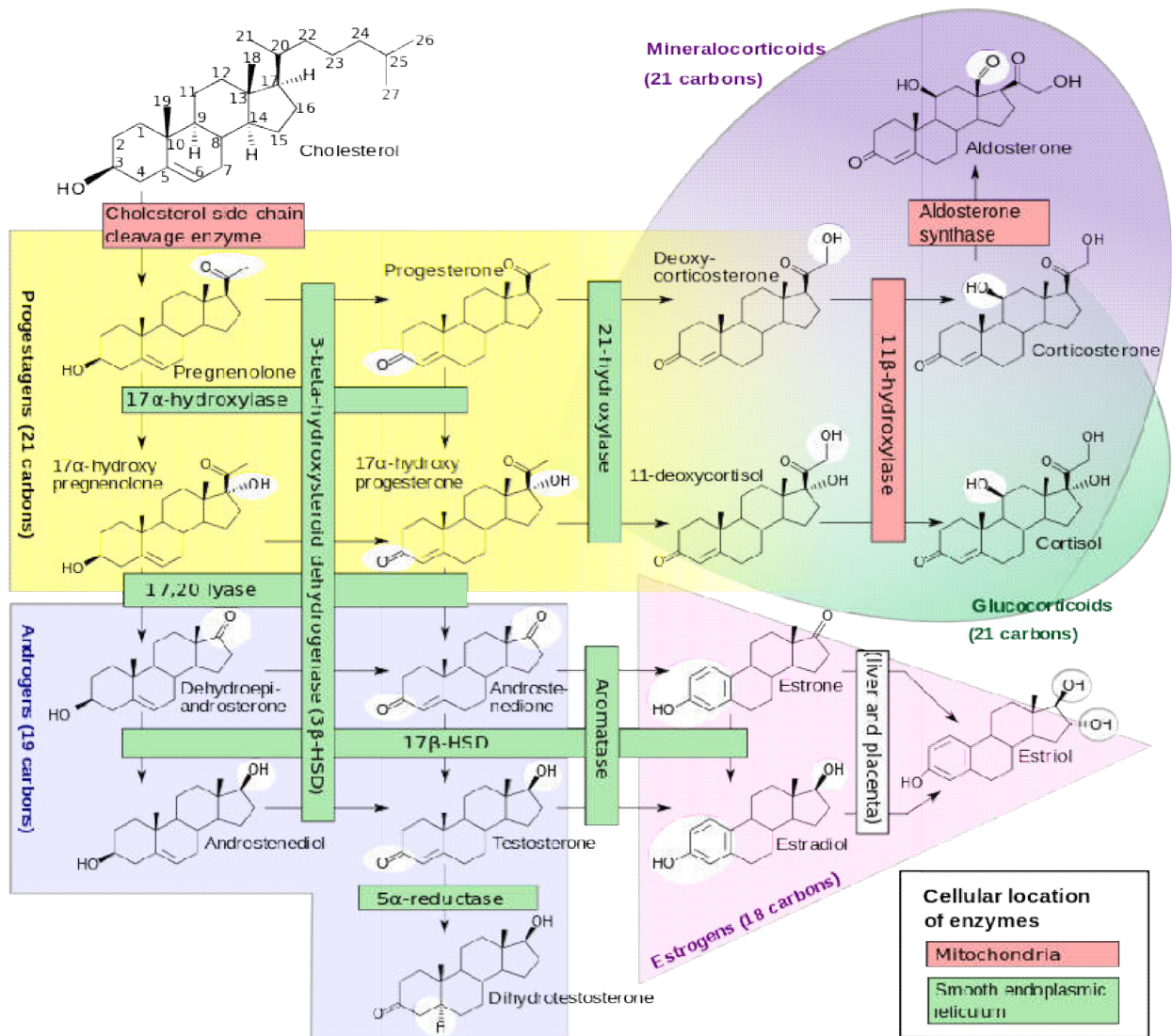


Figure 37. Voies de la stéroïdogénèse incluant la synthèse du cortisol [130]

De nombreuses hypothèses ont été avancées dans le but d'expliquer le lien entre le cholestérol et la dépression. Certaines études ont révélé que les faibles niveaux de cholestérol sériques sont associés à des niveaux bas de sérotonine chez les patients suicidaires dépressifs [126, 127]. En 1992, Engelberg [133] a avancé une hypothèse pour expliquer la relation entre le

taux bas du cholestérol et la réduction de la sérotonine cérébrale et de ces récepteurs. Cette hypothèse s'appuie sur le rôle primordial du cholestérol présent au niveau des membranes neuronales dans le maintien de leur rigidité permettant ainsi une bonne exposition des récepteurs.

Maes et al. [134] se sont plutôt focalisés sur l'aspect génétique de cette anomalie. Ils rapportent que les faibles concentrations du cholestérol pourraient être la conséquence d'une anomalie génétique reliée au chromosome 16 qui comporte le gène codant pour la *Lecithine cholesterol acetyl transférase* (LCAT), l'enzyme qui catalyse l'estérification du cholestérol. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la diminution de la concentration du cholestérol estérifié, relié à un dysfonctionnement du chromosome 16, peut augmenter la susceptibilité à la dépression par altération de la viscosité des membranes cellulaires des neurones.

Nos résultats sont en accord avec ces travaux vu l'hypocholestérolémie détectée dans les groupes SS et SM. Bien que la baisse du cholestérol ne soit pas significative, le groupe SC montre cette tendance.

## **8. Transaminases**

Les transaminases sont présentes dans tous les tissus, mais leur présence dans le sang à une concentration élevée est souvent liée à des maladies du myocarde (infarctus) ou du foie (nécrose, hépatite). Cet effet est retrouvé dans nos résultats pour l'activité de l'ASAT, qui a augmentée significativement dans les groupes SS et SC, et pour l'activité de l'ALAT, qui a connu elle aussi une augmentation significative uniquement dans le groupe SS. Les groupes de stress n'ayant pas connu une élévation de ces taux, ont montré une tendance à avoir des concentrations plasmatiques élevées en transaminases surtout celle de l'ALAT.

ASAT et ALAT participent à la néoglucogenèse en catalysant le transfert des groupes aminés de l'acide aspartique ou de l'alanine à l'acide céto-glutarique afin de produire de l'acide oxaloacétique et de l'acide pyruvique. Ce sont des enzymes importantes de la néoglucogenèse. Celle-ci étant augmentée en raison d'une hyperproduction surrénalienne de GC, se produit alors une augmentation du taux d'ALAT [135]. Nombreuses sont les études qui se sont intéressées à l'impact d'un stress prénatal sur les différentes régions cérébrales (cortex préfrontale, hippocampe, striatum ... etc.). Cependant, aucun rapport n'a été établi concernant les autres organes à l'exception du cœur [136]. Récemment, Van Waes et al. [137] ont montré qu'un stress prénatal altère les concentrations plasmatiques des transaminases évaluées chez des rats de 10 mois.

De même, Mei Jia et ses coéquipiers [136] ont investigué les effets d'un stress prénatal sur plusieurs fonctions périphériques, y compris, la fonction hépatique. Leurs travaux ont montré que l'exposition à un stress chronique stimule l'apoptose des hépatocytes chez le Rat. Nos résultats soutiennent l'hypothèse de l'altération du tissu hépatique après exposition au stress. Les mécanismes impliqués dans le déclenchement de l'apoptose sont encore méconnus.

Par ailleurs, Zelber-Sagi et al. grâce à leur étude prospective faite sur plus de 12 000 employés, ont pu détecter une corrélation positive entre des taux élevés d'ALAT et l'incidence d'une dépression. Ils rapportent également que cette corrélation ALAT/dépression serait médiée par des processus inflammatoires [138].

En effet, il y a de plus en plus de rapports scientifiques qui soulèvent la part des cytokines-adipokines et chimiokines inflammatoires dans la survenue du syndrome de dépression comme illustré dans la revue de Neveu et Dantzer [139]. Le lien intime entre le système immunitaire et le système nerveux est du, d'une part, à l'innervation sympathique et parasympathique des ganglions lymphatiques, et d'une autre part, à la présence de récepteurs cytokinergiques au niveau du système nerveux central [111, 135, 136].

Les relations entre les cytokines et le cerveau mettent en jeu deux compartiments différents: le compartiment des cytokines périphériques qui sont synthétisées en réponse à des réactions inflammatoires, immunitaires ou allergiques et le compartiment des cytokines centrales ou cérébrales dont la production est liée aux phénomènes de neuroplasticité mis en jeu au cours du développement [142]. Ces deux compartiments jouent un rôle important dans les altérations physiologiques, comportementales et neuroendocriniennes qui apparaissent au cours des syndromes inflammatoires et infectieux. Bien que ces deux compartiments soient séparés par la barrière hémato-encéphalique, ils peuvent agir de façon coordonnée. Les cytokines libérées en périphérie peuvent transcender la barrière hématoencéphalique et induire la production de cytokines cérébrales. Les cytokines centrales, en agissant sur leurs cibles cellulaires, seraient alors responsables des altérations cérébrales, physiologiques, comportementales et neuroendocriniennes observées au cours des phénomènes infectieux et inflammatoires [139].

Le système nerveux central est donc informé de l'activation du système immunitaire périphérique grâce au relais de certaines cytokines telles que IL-1 $\beta$ , d'IL-6 et de TNF- $\alpha$  [109, 110, 138]. D'autre part, il est connu que les cellules immunitaires sont sensibles aux stimulations corticotropes du fait de l'expression des GR et des récepteurs adrénergiques sur leurs surfaces [140, 141].

Par ailleurs, le stress a longtemps été considéré comme immunosuppresseur parce qu'il inhibe certaines fonctions lymphocytaires [139, 142] telles que leur prolifération [143, 144]. Cependant, l'inhibition des lymphocytes par le stress n'est pas systématique. Le stress peut parfois augmenter la production d'anticorps et la prolifération des lymphocytes [145, 146].

Les données sur ce sujet sont très disparates. Ceci est probablement dû au fait que ces résultats proviennent d'études réalisées sur des espèces et des lignées d'animaux différentes, utilisant divers facteurs de stress, avec des durées et des fréquences variables.

L'étude des éléments figurés du sang, en particulier les cellules immunitaires, a révélé que, globalement, nos paradigmes de stress prénatal utilisés dans le cadre de notre étude ont généré une augmentation de la concentration plasmatique des lymphocytes, leucocytes, neutrophiles et monocytes, à l'exception du stress de contention qui s'est démarqué par une tendance à avoir des concentrations basses de neutrophiles et monocytes circulantes. Sur la base des études ayant pour but de comprendre les effets du stress maternel sur le système immunitaire de la descendance, il est admis que l'immunité innée a tendance à être inhibée par le stress prénatal [151] exprimé par la baisse du nombre circulant de neutrophiles et macrophages. A titre d'exemple, des travaux réalisés sur les singes montrent que ceux dont les mères étaient exposées à un stress gestationnel chronique, avaient une prolifération plus faible des cellules immunitaires par rapport aux descendants non stressés. Cette prolifération qui est déclenchée suite à un stimulus, suggère des altérations persistantes de la capacité du système immunitaire à répondre adéquatement à un agent pathogène [152]. Chez l'Homme, les expériences de stress gestationnel sont associées à une augmentation de l'incidence d'allergies et d'asthme chez l'enfant, ainsi qu'à une réduction de la réponse à l'infection et une immunité réduite à la naissance [153]. Par contre, nos résultats semblent indiquer une prolifération des cellules immunitaires circulantes à l'adolescence, et ce profil concorde avec les études de Vanbesien et al. [113] et de Chavez et co. [154] qui ont confirmé qu'un stress prénatal augmente le profil proinflammatoire, probablement biaisé par une hyper sécrétion d'interleukines proinflammatoires tels que : IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  chez des rats âgés de 4 à 8 mois. Cependant, et contrairement à ce qui a été noté dans notre étude, aucune modification de ce profil proinflammatoire n'a été détectée chez les rats juvéniles (7 semaines) dans l'étude de Vanbesien [113].

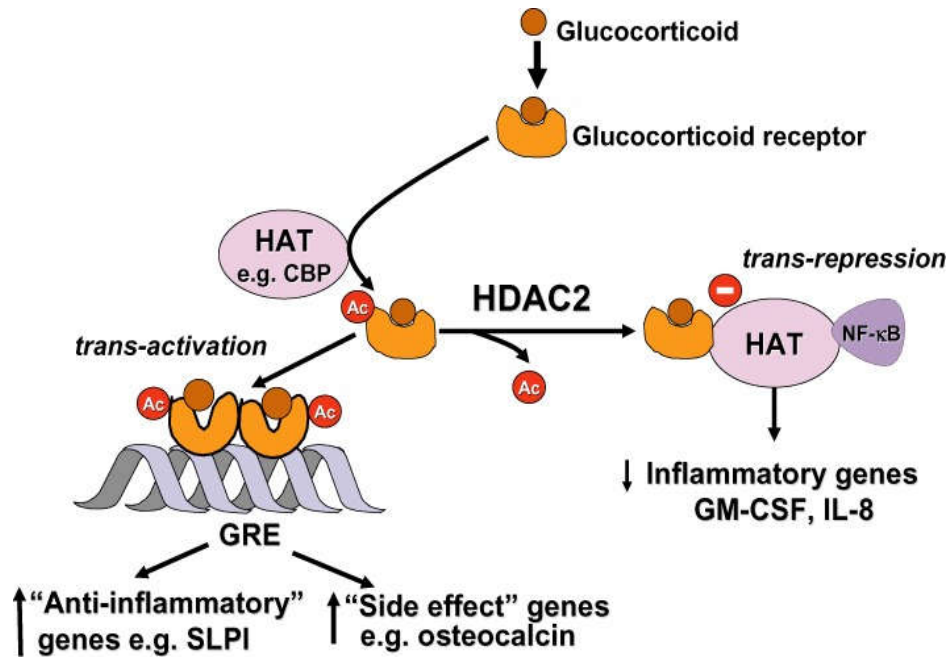
Les glucocorticoïdes sont connus pour leur activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice [155]. Lors d'une réponse inflammatoire, ils inhibent la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et les lymphocytes T, ils contribuent dans la

régulation de la réponse de fièvre et favorisent la production de protéines de la phase aiguë par le foie [156]. Ils inhibent aussi 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 [156]. Les catécholamines orientent la différenciation des cellules T, modulent la prolifération lymphocytaire, l'activité bactéricide des macrophages et l'activité cytotoxique des NK [145].

Au regard de l'hyperactivité basale de l'axe HPA et de la prolifération cellulaire induite, une résistance à l'effet immunosuppresseur des GC pourrait être à l'origine de la prolifération anormale des cellules immunes.

En temps normal, Les glucocorticoïdes influencent fortement le phénotype, la survie et les fonctions des monocytes et des macrophages. Ils augmentent le potentiel phagocytaire de ces cellules effectrices importantes, et stimulent ainsi l'élimination des antigènes, des agents pathogènes, des cellules inflammatoires, des débris cellulaires et d'autres éléments potentiellement nocifs [157].

Ils suivent le mode d'action suivant : Les GC suppriment l'expression des gènes inflammatoires activés dans les maladies inflammatoires chroniques (tel que l'asthme), par désacétylation des histones de ces gènes. Cette désacétylation se fait par le biais de la *Histone deacetylase 2* (HDAC2) [158], qui se retrouve activée en se liant au complexe monomérique : GC-GR. (**Figure 38**)



**Figure 38** : Mécanisme moléculaire de l'activation de transcription des gènes « anti-inflammatoires » et la désactivation de la voie NFκB par les glucocorticoïdes via acétylation et désacétylation des histones. Le complexe GC-GR formé se lie à un autre complexe, dit « activateur » grâce à la fonction d'acétylation des histones qui va permettre la transcription du génome (trans-activation). Ce mécanisme permet la transcription des protéines anti-inflammatoires telles que *Secretory Leucoprotease Inhibitor* (SLPI). De plus, l'action anti-inflammatoire des GC est dû aussi à l'inhibition de la transcription de la voie NFκB par grâce à la fixation d'un monomère désacétylé de GC sur le complexe activateur. La désacétylation du GC et sa fixation sur ce complexe induisent l'inhibition de l'activité d'acétylation des histones ce dernier et donc inhibition de la transcription. De plus, Le complexe GC-GR recrute une enzyme de désacétylation : *Histone Deacetylase 2*(HDAC 2) qui désacétyle les histones et assure un bon verrouillage des gènes de la proinflammation. Schéma tiré de «Glucocorticosteroids: current and future directions»[159].

les monomères GR interagissent avec les sites de reconnaissance de l'ADN pour activer la transcription en augmentant l'acétylation des histones des gènes anti-inflammatoires cela est possible grâce à un groupe d'enzymes connues sous le nom : *Histone Acetyl Transferase* (HAT): [157].

A côté de cela, il existe un autre mécanisme intracellulaire qui permet de convertir le stress en réponse inflammatoire. En fait, le facteur transcriptionnel *Necrosis Factor κB* (NFκB), responsable de l'expression des cytokines proinflammatoires des monocytes sanguins, peut être activé par la noradrénaline via ces récepteurs α1- et β adrénergique [160].

Il a pu être montré qu'un stress chronique réduit la sensibilité des cellules immunitaires aux GC [161]. Ainsi, la prolifération cellulaires et la production des cytokines proinflammatoires se

trouvent moins inhibées par les GC. Le mécanisme moléculaire proposé à cet égard, implique la migration cytoplasmique du complexe GC-GR qui semble être bloquée [161], ce qui lève l'inhibition de la transcription des gènes de la voie NFκB.

En outre, l'accélération du métabolisme énergétique (lipides, glucide et protéines) provoque un déséquilibre de la balance Oxydant/antioxydant en faveur des molécules oxydantes [158]. De plus en plus de rapports scientifiques confirment le lien existant entre le stress émotionnel et le stress oxydant [162] par le biais de l'axe HPA et l'effet modulateur des GC [163].

D'autre part, le stress oxydatif semble pouvoir affecter la fonction de la HDAC 2 et donc réduire l'inhibition faite par les GC sur la transcription de la voie NFκB [155]. Plusieurs études ont confirmé la présence d'un taux élevé de stress oxydant notamment au niveau de l'hippocampe et autres structures cérébrales chez une progéniture stressée prénatalement [164], [165]. Cette présence pourrait, du moins en partie, expliquer la surexpression des IL2R détectés au niveau central dans notre étude. Il est à noter également que les GC, par leur effets anti inflammatoire, inhibe la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les cellules immunes, notamment les phagocytes, et au niveau des cellules nerveuses (Hippocampe) [165], [166]. La résistance des cellules immunes aux GC lève l'inhibition de ces derniers sur un groupe d'enzymes appelée NADPH oxydase (NOX), responsables de la génération de l'anion superoxyde, ce qui renforce le statut inflammatoire par la synthèse des protéines proinflammatoires [162]. Bouayad et son équipe [167] ont pu montrer dans leur étude menée sur des souris Swiss albinos males l'existence d'une corrélation positive entre le stress oxydant détecté dans les cellules sanguines périphérique (granulocytes) et le degré d'anxiété. De plus, les travaux de Bouvier ont révélé que la diminution sérique du facteur trophique dérivé du cerveau BDNF (*Brain derived neurotrophic factor*), a été associée à un état de stress oxydant à l'origine de l'atrophie de l'hippocampe et de l'état anxieux détecté chez des rats stressé préalablement [168]. Le BDNF marqueur de la croissance neuronale, joue un rôle primordial dans la transcription de protéines antioxydantes ce qui permet la rééquilibration de la balance Oxydant/antioxydant dans le SNC [168]. Le cerveau est un organe très vulnérable au stress oxydant du fait de sa grande consommation d'oxygène (20% de l'oxygène total de l'organisme pour 2% du poids total du corps) et de sa composition qui est essentiellement lipidique [167]. En outre, Zou et al. ont pu mettre en lumière le rôle d'un stress oxydant, induit par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro sur des cellules hippocampiques, dans l'apparition d'une toxicité neuronale [169]. Ses travaux ont également montré qu'un stress oxydatif augmente l'activité du facteur transcriptionnel NFκB, impliqué dans la réponse inflammatoire.

En outre, nous ne pouvons pas exclure le rôle de ces cytokines pro-inflammatoires comme étant des stimulants puissants de l'axe HPA et d'autres molécules liées au stress telles que les catécholamines. En effet, il a été montré que le stress prénatal augmente les concentration d'IL-1b chez le Rat à la fois dans les splénocytes et dans le cerveau [170]. Etant donné que l'IL-1b agit en diminuant l'affinité des récepteurs de corticostéroïdes dans l'hippocampe [171], cela pourrait contribuer à l'augmentation de l'activité de l'axe HPA dans la progéniture adulte stressée in utero [172].

## 9. Immunohistochimie

Rappelons que les résultats enregistrés à l'issue de l'étude comportementale ont montré chez les rats stressés un degré d'anxiété important, une exploration altérée et une locomotricité réduite. Pour expliquer ces résultats nous avons évalué le système IL2/IL2R car certaines études le désignent comme relais important entre le système immunitaire et le système nerveux. Nos résultats montrent une linéarité entre la prolifération des cellules immunitaires circulantes (FNS) et le taux d'expression des IL2R (IHC). Cette expression est très élevée dans les groupes stressés notamment SS par rapport au témoin.

Nos résultats concordent avec des travaux antérieurs qui ont rapporté l'expression des CD25 par des cellules du système nerveux [173], [174]. Toutes les régions ici étudiées, à savoir : cortex préfrontal (PFC), Cortex Moteur M1 (CxM1), Striatum (*caudal putamen* : CP) et hippocampe (Hipp) ont connu une expression très élevée des CD 25 dans le groupe SS, suivie par le groupe SM. Ce dernier a connu une expression moins importante dans toutes les régions à l'exception du cortex préfrontal et de l'hippocampe où la concentration des CD25 était élevée et comparable à celle du groupe SS.

Cette dernière observation pourrait expliquer le degré d'anxiété élevé dans le groupe SM. En effet une expression intense d'un récepteur donné à la surface d'une cellule indique une stimulation accrue et de long terme de son expression par son ligand. Ceci prouve à dire que les concentrations centrales d'IL-2 sont proportionnelles à l'expression de ses récepteurs.

Les cytokines participent à la coordination des différentes réponses (immunes, physiologiques et métaboliques) à l'infection et à l'inflammation qui constituent la réaction de la phase aiguë. Les composantes nerveuses de la réaction de la phase aiguë sont la fièvre, l'activation de l'axe corticotrope ainsi que de profondes altérations comportementales comme la

perte de l'appétit, la somnolence ou la diminution de l'intérêt social. Ces symptômes sont dus à la présence des récepteurs spécifiques à ces cytokines au niveaux du système nerveux [139].

Les effets des cytokines sur le système neuroendocrinien ont été essentiellement étudiés sur l'axe HPA. L'activation de l'axe corticotrope au cours de réactions inflammatoires se traduit par une augmentation de synthèse et de la libération de CRF, une augmentation de la production d'ACTH et de GC. Les cytokines, IL1, IL6 et TNF, entraînent de façon dose-dépendante une production d'ACTH et de glucocorticoïdes [175]. En retour, Les glucocorticoïdes inhibent la synthèse et la libération des cytokines inflammatoires au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel [157]. L'interleukine 2 est l'une des cytokines exprimées par les cellules du système nerveux et dont la fonction ne cesse de susciter beaucoup d'intérêt et qui n'est pas encore clairement établie [176]. Les connaissances disponibles au sujet de son rôle central dans la régulation des fonctions immunitaires dépassent son simple rôle en tant que facteur de croissance des lymphocytes T [177]. En plus de ses fonctions immunomodulatrices en tant que facteur de croissance de toutes les populations de lymphocytes T, des études en neuroendocrinologie et en neurobiologie ont rapporté des effets de neuromodulation de l'IL2 [177]. Ceci explique les modifications comportementales telle que la dépression observée notamment au cours de traitement anticancéreux par des cytokines (immunothérapie) [80, 178]; elles définissent le syndrome de malaise (*Sickness Behavior*) [139]. L'IL2 est majoritairement synthétisée par les lymphocytes T helper de type 1, destinées vers une réponse immunitaire cellulaire par recrutement des neutrophiles, macrophages, lymphocytes *Natural Killer*(NK), médiée par l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) [177].

Ces données peuvent au moins en partie expliquer à la fois la prolifération des cellules immunes (lymphocytose et neutrophilie) observée dans les groupes de stress, et la surexpression des IL2R au niveau du cerveau. Il se pourrait que la sous-population lymphocytaire majoritaire ici, soit les lymphocytes T qui ont orchestré, probablement par une surproduction d'IL2, la prolifération de ce type de cellules.

L'IL2 périphérique traverse la barrière hémato encéphalique et exerce, à son tour, un stimulus pour plus d'expression de ses récepteurs. De nombreuses études ont suggéré l'inhibition centrale de l'expression des GR par les cytokines centrales comme mécanisme pouvant participer dans la défaillance du feedback des GC [157]. Ces cytokines peuvent également provenir des adipocytes (TNF $\alpha$ , IL6, IL1- $\beta$ ) probablement insulino-résistantes [121] et qui renforce le statut inflammatoire périphérique et influence le fonctionnement du système nerveux

[179]. Cependant, l'IL2 peut provenir soit d'une synthèse périphérique par les lymphocytes et qui traversent la barrière hémato encéphalique, ou alors, proviennent d'une synthèse locale par les neurones et les cellules gliales [177]. Ces mêmes cellules sont également capables de synthétiser les IL2R. Dans le cerveau normal du rat et de l'homme, le système IL2/IL2R est principalement localisé au niveau de l'hippocampe, l'hypothalamus, le striatum, septum, locus coeruleus, cortex frontal et cervelet [177].

D'autre part, les altérations comportementales observées dans les groupes de stress, notamment le groupe SS, sont proportionnelles aux taux d'expression des IL2R détectée par IHC. Ceci prêche à dire que l'IL2 agit à plusieurs niveaux du cerveau et influence négativement le comportement et la locomotion des individus. L'altération du feedback négatif des GC pourrait également être due à une présence accrue des IL2 au niveau de l'hippocampe.

Le striatum, structure clé dans le contrôle de la coordination motrice et l'équilibration [47], [104] semble, quant à lui, exprimer de manière importante les récepteurs d'IL2 notamment dans le groupe de stress sonore. Le dénombrement de cellules marquées à la streptavidine au niveau du striatum a été comparable dans les groupes du stress de contention et stress mixte. Seuls les échantillons provenant du groupe de stress sonore ont connu une présence remarquable de ces cellules fluorescentes. Une telle densité de cellules exprimant des IL2R indique que ces cellules sont une cible majeure de l'IL2.

Bien que le rôle d'IL2 au niveau du SNC reste méconnu, plusieurs études ont tenté de rechercher ces effets chez le rat par injection directe in vivo, culture in vitro, ou traitement prolongé. Les résultats montrent que les effets observés sont dose-dépendants [180] et peuvent aller d'une stimulation de la croissance neuronale et celle des cellules gliales jusqu'à la dégénérescence de celles-ci. Stimulation de la croissance des neurones sympathiques, croissance et survie des structures neuronale corticales (hippocampe et striatum), augmentation de la prolifération des oligodendrocytes et autres effets régénérateurs ont été rapportés par des études in vitro [177]. Cependant, lorsque la dose de traitement augmente et/ou le traitement devient chronique, on a remarqué plutôt des effets dégénératifs tels que l'inhibition de la prolifération des oligodendrocytes, toxicité envers les oligodendrocytes cultivées in vitro, altération de la morphologie cérébrovasculaire et démyélination occasionnelle [177]. Une exposition prolongée aux IL2 induit donc des dommages tissulaires au niveau du cerveau [181] ce qui pourrait perturber le comportement et l'homéostasie du sujet.

Il est à noter que le transfert des médiateurs immuns circulants, de la périphérie vers le SNC est généralement assuré par un système de transporteur saturable, à l'exception de l'IL2 qui traverse la barrière hémato-encéphalique sans contrainte de saturation. L'intérêt de cette particularité de transport est jusqu'à alors non élucidée [182].

Nos résultats montrent que les altérations neurocomportementales et physiologiques, notamment dans le groupe SS, sont associées à une densité élevée des IL2R centraux. Très peu d'études ont exploré le système IL2/IL2R central dans suite à une exposition au stress, et aucune étude ne l'a fait dans le cas d'un stress prénatal. Par contre, l'impact de l'environnement prénatal sur l'expression des IL2R a été évaluée précédemment dans les travaux de Singh [183] qui a montré que la CRF avait un effet stimulant sur l'expression des IL2R au niveau de lymphocytes T cultivées humaines *in vitro*.

La surexpression des IL2R a été induite par des IL2, cependant, la provenance de ce dernier reste méconnue. Deux explications sont possibles soit ; une sécrétion *in situ* par les cellules gliales ; soit par les lymphocytes T périphériques.

L'exposition prénatale de l'individu aux GC maternels et/ou médiateurs immuns maternels pourrait influencer la programmation développementale du cerveau et induire des perturbations homéostatiques et comportementale après la naissance [184]. Le système IL2/IL2R exprimé au niveau de SNC pourrait être une des cibles de ces médiateurs. Les affections qui surgissent plus tard dans la vie seraient donc liés aux régions ayant été sujettes à cette modulation. En effet, l'IHC montre que le marquage était important dans le cortex moteur et striatum; siège du contrôle de la coordination motrice [47], l'hippocampe ; structure clé dans le rétrocontrôle de l'axe HPA [185], le cortex préfrontal ; structure directement lié à l'habituation, la prise de décision et l'adaptation comportementale la collecte d'information sensorielles (ex : olfactives) [186]. A la lumière de toutes ces données, nous pouvons suggérer que les altérations comportementales relevées dans cette étude pourraient être induites par le biais de l'IL2.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Les résultats obtenus dans ce travail de thèse nous ont permis de confirmer l'importance des événements vécus durant la période de conception dans le développement neurophysiologique du fœtus. Globalement nos résultats rejoignent d'autres qui ont montré que les effets du stress prénatal varient en fonction de la nature et de l'intensité du stress. Nous avons également pu vérifier l'hypothèse d'Evans qui stipule qu'un stress environnemental multiple n'implique pas forcément la sommation des effets des stressors composants sur le comportement, probablement grâce à la capacité d'habituation de l'organisme vivant. Cependant cette faculté adaptative reste imprévisible car elle est tantôt efficace avec des effets modérés du stress (cas de stress mixte), tantôt limitée en donnant des effets prononcés (cas de stress sonore). Très peu de travaux ont investigué cette hypothèse par application directe d'un stress multiple, ou encore, par application in utero d'un stress multiple. Dans ce contexte, nos résultats ont montré pour la première fois qu'un stress multiple engendre chez la progéniture moins d'effets délétères sur le comportement explorateur, la locomotion et le système neuroimmunoendocrinien, avec cependant une amplification du degré d'anxiété.

Nos résultats révèlent, d'une manière singulière, une linéarité entre les troubles endocriniens (ACTH), comportementaux et locomoteurs d'un côté, et l'expression des IL2R au niveau de certaines régions cérébrales. Cela suggère que les événements perçus pendant la vie intra utérine et considérés comme agressifs par l'individu, pourraient le prédisposer à développer des maladies neurodégénératives et autoimmunes.

De plus, nous avons vu qu'il y avait une altération de la fonction olfactive des rats et de leur capacité d'équilibration à l'âge juvénile, et ce uniquement par le stress sonore. Etant donné que le Rat est un animal macrosmate, la perte de l'odorat peut compromettre la survie de l'individu vu qu'il l'utilise pour communiquer avec ses congénères, se reproduire et se nourrir. Par ailleurs, l'application du stress sonore suivie par la contention a nettement réduit ces effets. La même observation a été faite dans le cas de certains paramètres biochimiques marqueurs de fonctions périphériques. Le stress multiple avait également réduit la prolifération des cellules immunes et l'expression des récepteurs à IL2 induite par le stress sonore appliqué individuellement.

L'hypothèse de l'expression des effets d'un stress mixte en différentes modalités chez la progéniture a été vérifiée dans ce travail en montrant son applicabilité sur les rats exposés prénatalement à un stress multiple. Nos résultats ont montré qu'une telle exposition peut engendrer des effets moins prononcés que ceux observés suite à une application individuelle des

stresseurs composants. A l'exception du degré d'anxiété qui a été relativement élevé, tous les paramètres physiologiques et somatiques ici étudiés ont connu des altérations modérées voire leur absence totale à cet âge. Une telle interaction entre stressseurs permettant de « tamponner » les perturbations neurophysiologiques, mérite une analyse plus approfondie des processus neurobiologiques qui y sont impliqués.

Les mécanismes mis en jeu dans une telle modulation neuroimmunoendocrinienne et comportementale sont encore méconnus, et d'autres études plus approfondies sont nécessaires pour éclairer cette zone d'ombre reliant ces trois systèmes centraux : immunitaire, endocrinien et nerveux. Pour ce faire, nous projetons en perspectives, de développer les éléments suivants :

- l'étude du comportement maternel pré et post natal qui constitue un facteur épigénétique primordial dans le développement neurologique des ratons ;
- Elimination de l'interférence entre altérations neurocomportementales de la progéniture causées par un déficit des soins maternels, et les altérations induites par les stress prénatal. Un *cross -fostering* (croisement de nids) pourra isoler ces deux facteurs qui influencent grandement le développement postnatal de la progéniture ;
- Une étude phénotypique détectant les polymorphismes adaptatifs de la population ;
- L'étude du profil cytokinique périphérique pour confirmer le statut pro inflammatoire observé ;
- L'étude histologique du tissu adipeux pour confirmer l'hyperplasie des adipocytes ainsi que la résistance à l'insuline ;
- L'identification des populations lymphocytaires par cytométrie en flux.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- [1] R. Häusler, « [The effects of acoustic overstimulation] », *Ther. Umsch. Rev. Ther.*, vol. 61, n° 1, p. 21-29, janv. 2004.
- [2] « OMS | La dépression », WHO. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs369/fr/>. [Consulté le: 07-juin-2017].
- [3] H. Selye, « A syndrome produced by diverse nocuous agents. 1936 », *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, vol. 10, n° 2, p. 230-231, 1998.
- [4] G. P. Chrousos et P. W. Gold, « The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis », *JAMA*, vol. 267, n° 9, p. 1244-1252, mars 1992.
- [5] M. F. Juruena, « Early-life stress and HPA axis trigger recurrent adulthood depression », *Epilepsy Behav.*, vol. 38, p. 148-159, sept. 2014.
- [6] E. J. Nestler, « Transgenerational Epigenetic Contributions to Stress Responses: Fact or Fiction? », *PLoS Biol.*, vol. 14, n° 3, mars 2016.
- [7] N. Krementsov, *Stalinist Science*. Princeton University Press, 1996.
- [8] L. Cao-Lei *et al.*, « DNA methylation mediates the impact of exposure to prenatal maternal stress on BMI and central adiposity in children at age 13½ years: Project Ice Storm », *Epigenetics*, vol. 10, n° 8, p. 749-761, août 2015.
- [9] Y. Zeng, N. M. Brydges, E. R. Wood, A. J. Drake, et J. Hall, « Prenatal glucocorticoid exposure in rats: programming effects on stress reactivity and cognition in adult offspring », *Stress*, vol. 18, n° 3, p. 353-361, mai 2015.
- [10] A. Caspi, A. R. Hariri, A. Holmes, R. Uher, et T. E. Moffitt, « Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits », *Am. J. Psychiatry*, vol. 167, n° 5, p. 509-527, mai 2010.
- [11] R. J. Cabrera, E. L. Rodríguez-Echandía, A. S. G. Jatuff, et M. Fóscolo, « Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight, preweaning mortality and rat behavior », *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 32, n° 10, p. 1229-1237, oct. 1999.
- [12] J. D. Benoit, P. Rakic, et K. M. Frick, « Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression », *Behav. Brain Res.*, vol. 281, p. 1-8, mars 2015.
- [13] M. Basner *et al.*, « Auditory and non-auditory effects of noise on health », *The Lancet*, vol. 383, n° 9925, p. 1325-1332, avr. 2014.
- [14] M. Weinstock, « The long-term behavioural consequences of prenatal stress », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, n° 6, p. 1073-1086, août 2008.
- [15] Y. Zheng, W. Fan, X. Zhang, et E. Dong, « Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus », *Epigenetics*, vol. 11, n° 2, p. 150-162, févr. 2016.
- [16] A. Appart, A.-K. Lange, I. Sievert, F. Bihain, et D. Tordeurs, « Le trouble de l'adaptation et le DSM-5 : une revue de la littérature », *L'Encéphale*.
- [17] R. Yehuda, S. M. Engel, S. R. Brand, J. Seckl, S. M. Marcus, et G. S. Berkowitz, « Transgenerational Effects of Posttraumatic Stress Disorder in Babies of Mothers Exposed to the World Trade Center Attacks during Pregnancy », *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, n° 7, p. 4115-4118, juill. 2005.
- [18] J. van Os et J. P. Selten, « Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands », *Br. J. Psychiatry J. Ment. Sci.*, vol. 172, p. 324-326, avr. 1998.
- [19] S. Babri, M.-H. Doosti, et A.-A. Salari, « Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 37, p. 164-176, mars 2014.
- [20] L. R. Meek, K. M. Burda, et E. Paster, « Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning », *Physiol. Behav.*, vol. 71, n° 5, p. 543-549, déc. 2000.
- [21] R. Graignic-Philippe *et al.*, « Le stress prénatal : état de la question et perspectives », *Neuropsychiatr. Enfance Adolesc.*, vol. 53, n° 1-2, p. 54-61, févr. 2005.

- [22] M. L. Schneider et C. L. Coe, « Repeated social stress during pregnancy impairs neuromotor development of the primate infant », *J. Dev. Behav. Pediatr. JDBP*, vol. 14, n° 2, p. 81-87, avr. 1993.
- [23] M. Nazeri, M. Shabani, S. Ghotbi Ravandi, I. Aghaei, M. Nozari, et S. Mazhari, « Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors », *Physiol. Behav.*, vol. 142, p. 155-160, avr. 2015.
- [24] A.-M. Le Bon, A. Tromelin, T. Thomas-Danguin, et L. Briand, « Les récepteurs olfactifs et le codage des odeurs », *Cah. Nutr. Diététique*, vol. 43, n° 6, p. 282-288, déc. 2008.
- [25] R. L. Doty, « Odor-guided behavior in mammals », *Experientia*, vol. 42, n° 3, p. 257-271, mars 1986.
- [26] B. G. Galef Jr et S. W. Wigmore, « Transfer of information concerning distant foods: A laboratory investigation of the 'information-centre' hypothesis », *Anim. Behav.*, vol. 31, n° 3, p. 748-758, août 1983.
- [27] K. Mori, « Membrane and synaptic properties of identified neurons in the olfactory bulb », *Prog. Neurobiol.*, vol. 29, n° 3, p. 275-320, 1987.
- [28] M. A. de Souza, R. E. Szawka, L. A. Centenaro, L. A. Diehl, et A. B. Lucion, « Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference », *Physiol. Behav.*, vol. 105, n° 3, p. 850-855, févr. 2012.
- [29] C. A. Wilson, A. Vazdarjanova, et A. V. Terry, « Exposure to variable prenatal stress in rats: effects on anxiety-related behaviors, innate and contextual fear, and fear extinction », *Behav. Brain Res.*, vol. 238, p. 279-288, févr. 2013.
- [30] R. B. Postuma et A. Dagher, « Basal ganglia functional connectivity based on a meta-analysis of 126 positron emission tomography and functional magnetic resonance imaging publications », *Cereb. Cortex N. Y. N 1991*, vol. 16, n° 10, p. 1508-1521, oct. 2006.
- [31] J. O'Keefe et L. Nadel, *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford: Clarendon Press, 1978.
- [32] G. W. Evans, *Environmental Stress*. CUP Archive, 1984.
- [33] Martinportugès et Luis Gomez Jacinto, « Simultaneous multiple stressors in the environment: Physiological stress reactions, performance, and stress evaluation », *Psychol. Rep.*, vol. 97, p. 867-874, 2005.
- [34] S. Maccari et S. Morley-Fletcher, « Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 32, Supplement 1, p. S10-S15, août 2007.
- [35] W. K. Whitten, « Modification of the oestrous cycle of the mouse by external stimuli associated with the male; changes in the oestrous cycle determined by vaginal smears », *J. Endocrinol.*, vol. 17, n° 3, p. 307-313, sept. 1958.
- [36] I. L. Ward et J. Weisz, « Differential Effects of Maternal Stress on Circulating Levels of Corticosterone, Progesterone, and Testosterone in Male and Female Rat Fetuses and Their Mothers », *Endocrinology*, vol. 114, n° 5, p. 1635-1644, mai 1984.
- [37] R. Diaz, R. W. Brown, et J. R. Seckl, « Distinct Ontogeny of Glucocorticoid and Mineralocorticoid Receptor and 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Types I and II mRNAs in the Fetal Rat Brain Suggest a Complex Control of Glucocorticoid Actions », *J. Neurosci.*, vol. 18, n° 7, p. 2570-2580, janv. 1998.
- [38] L. Bardin, N. Malfetes, A. Newman-Tancredi, et R. Depoortère, « Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies », *Behav. Brain Res.*, vol. 205, n° 2, p. 360-366, déc. 2009.
- [39] X. Yang *et al.*, « Chronic restraint stress decreases the repair potential from mesenchymal stem cells on liver injury by inhibiting TGF- $\beta$ 1 generation », *Cell Death Dis.*, vol. 5, n° 6, p. e1308, juin 2014.
- [40] A. von Eckardstein, « Restraint Stress Restrains Cholesterol in the Intestine », *Circ. Res.*, vol. 111, n° 11, p. 1391-1394, sept. 2012.
- [41] C. Smith, « Using Rodent Models to Simulate Stress of Physiologically Relevant Severity: When, Why and How », in *Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend*, X. Qian, Éd. InTech, 2012.

- [42] Hall, C.S., « Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality », *J. Comp. Psychol.*, vol. 18, n° 3, p. 385-403, 1934.
- [43] R. Plomin, J. C. DeFries, G. E. McClearn, et M. Rutter, *Des gènes au comportement: Introduction à la génétique comportementale*. De Boeck Supérieur, 1998.
- [44] K. C. Montgomery, « The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior », *J. Comp. Physiol. Psychol.*, vol. 48, n° 4, p. 254-260, août 1955.
- [45] S. Pellow, P. Chopin, S. E. File, et M. Briley, « Validation of open : closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat », *J. Neurosci. Methods*, vol. 14, n° 3, p. 149-167, août 1985.
- [46] C. Rainekei *et al.*, « Neonatal handling and the maternal odor preference in rat pups: Involvement of monoamines and cyclic AMP response element-binding protein pathway in the olfactory bulb », *Neuroscience*, vol. 159, n° 1, p. 31-38, mars 2009.
- [47] M. Pisa, « Motor functions of the striatum in the rat: Critical role of the lateral region in tongue and forelimb reaching », *Neuroscience*, vol. 24, n° 2, p. 453-463, févr. 1988.
- [48] R. J. Carter, J. Morton, et S. B. Dunnett, « Motor coordination and balance in rodents », *Curr. Protoc. Neurosci. Editor. Board Jacqueline N Crawley AI*, vol. Chapter 8, p. Unit 8.12, août 2001.
- [49] K.-H. Diehl *et al.*, « A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes », *J. Appl. Toxicol.*, vol. 21, n° 1, p. 15-23, 2001.
- [50] « Elecsys ACTH - Fact Sheet - EN\_ACTH\_FactSheet.pdf ». [En ligne]. Disponible sur: [http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia\\_ch/documents/broschueren/professional\\_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/fertilitaet-hormone/EN\\_ACTH\\_FactSheet.pdf](http://www.roche-diagnostics.ch/content/dam/corporate/roche-dia_ch/documents/broschueren/professional_diagnostics/serumarbeitsplatz/immunologie/fertilitaet-hormone/EN_ACTH_FactSheet.pdf). [Consulté le: 29-mai-2017].
- [51] E. Pankakoski et K. M. Tähkä, « Relation of adrenal weight to sex, maturity and season in five species of small mammals », *Ann. Zool. Fenn.*, vol. 19, n° 3, p. 225-232, 1982.
- [52] G. Paxinos et C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Academic Press, 2005.
- [53] C. Estanislau et S. Morato, « Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects », *Int. J. Dev. Neurosci.*, vol. 24, n° 4, p. 255-262, juin 2006.
- [54] A. V. Kalueff *et al.*, « The regular and light-dark Suok tests of anxiety and sensorimotor integration: utility for behavioral characterization in laboratory rodents », *Nat. Protoc.*, vol. 3, n° 1, p. 129-136, janv. 2008.
- [55] M. J. Meaney, M. Szyf, et J. R. Seckl, « Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health », *Trends Mol. Med.*, vol. 13, n° 7, p. 269-277, juill. 2007.
- [56] C. Jensen Peña, C. Monk, et F. A. Champagne, « Epigenetic Effects of Prenatal Stress on 11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase-2 in the Placenta and Fetal Brain », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 6, p. e39791, juin 2012.
- [57] S. Morley-Fletcher, M. Darnaudery, M. Koehl, P. Casolini, O. Van Reeth, et S. Maccari, « Prenatal stress in rats predicts immobility behavior in the forced swim test: Effects of a chronic treatment with tianeptine », *Brain Res.*, vol. 989, n° 2, p. 246-251, nov. 2003.
- [58] P. J. Brunton, « Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring », *Reproduction*, vol. 146, n° 5, p. R175-R189, janv. 2013.
- [59] F. Ohl, « Animal Models of Anxiety », in *Anxiety and Anxiolytic Drugs*, P. D. D. F. Holsboer et P.-D. D. A. Ströhle, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 2005, p. 35-69.
- [60] A. Galinowski et H. Lôo, « Biologie du stress », *Ann. Méd.-Psychol. Rev. Psychiatr.*, vol. 161, n° 10, p. 797-803, déc. 2003.
- [61] L. M. Shin et I. Liberzon, « The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders », *Neuropsychopharmacology*, vol. 35, n° 1, p. 169-191, juill. 2009.
- [62] C. Henry, M. Kabbaj, H. Simon, M. Le Moal, et S. Maccari, « Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats », *J. Neuroendocrinol.*, vol. 6, n° 3, p. 341-345, juin 1994.

- [63] E. R. de Kloet, J. M. H. M. Reul, et W. Sutanto, « Corticosteroids and the brain », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 37, n° 3, p. 387-394, nov. 1990.
- [64] S. E. Hyman, *Stress and the Brain: The Science of Mental Health*. Routledge, 2013.
- [65] C. Estanislau et S. Morato, « Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze », *Behav. Brain Res.*, vol. 163, n° 1, p. 70-77, août 2005.
- [66] E. C. Cottrell et J. R. Seckl, « Prenatal Stress, Glucocorticoids and the Programming of Adult Disease », *Front. Behav. Neurosci.*, vol. 3, sept. 2009.
- [67] L. A. Welberg, J. R. Seckl, et M. C. Holmes, « Inhibition of 11beta-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.*, vol. 12, n° 3, p. 1047-1054, mars 2000.
- [68] D. Liu *et al.*, « Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress », *Science*, vol. 277, n° 5332, p. 1659-1662, sept. 1997.
- [69] I. C. G. Weaver *et al.*, « Epigenetic programming by maternal behavior », *Nat. Neurosci.*, vol. 7, n° 8, p. 847-854, août 2004.
- [70] J. W. Smythe, W. B. Rowe, et M. J. Meaney, « Neonatal handling alters serotonin (5-HT) turnover and 5-HT<sub>2</sub> receptor binding in selected brain regions: relationship to the handling effect on glucocorticoid receptor expression », *Dev. Brain Res.*, vol. 80, n° 1-2, p. 183-189, juill. 1994.
- [71] J. Gräff, D. Kim, M. M. Dobbin, et L.-H. Tsai, « Epigenetic Regulation of Gene Expression in Physiological and Pathological Brain Processes », *Physiol. Rev.*, vol. 91, n° 2, p. 603-649, avr. 2011.
- [72] J. F. López, H. Akil, et S. J. Watson, « Neural circuits mediating stress », *Biol. Psychiatry*, vol. 46, n° 11, p. 1461-1471, déc. 1999.
- [73] A. Armario, R. M. Escorihuela, et R. Nadal, « Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals », *Neurosci. Biobehav. Rev.*, vol. 32, n° 6, p. 1121-1135, août 2008.
- [74] A. A. Octavi Martí, « Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. », *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.*, vol. 16, n° 3-4, p. 241-60, 1998.
- [75] N. H. Kalin, L. K. Takahashi, et F.-L. Chen, « Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus », *Brain Res.*, vol. 656, n° 1, p. 182-186, sept. 1994.
- [76] M. Bergomi, S. Rovesti, et G. Vivoli, « Biological response to noise and other physical stressors in places of entertainment », *Public Health Rev.*, vol. 19, n° 1-4, p. 263-275, 1992 1991.
- [77] A. Burow, H. E. W. Day, et S. Campeau, « A detailed characterization of loud noise stress: Intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation », *Brain Res.*, vol. 1062, n° 1-2, p. 63-73, nov. 2005.
- [78] M. Darnaudéry et S. Maccari, « Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress », *Brain Res. Rev.*, vol. 57, n° 2, p. 571-585, mars 2008.
- [79] R. Benediktsson, A. A. Calder, C. R. W. Edwards, et J. R. Seckl, « Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: a key regulator of fetal glucocorticoid exposure », *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 46, n° 2, p. 161-166, 1997.
- [80] V. Giraud, N. Rascle, et A. Ravaud, « Étude des effets dépressogènes des immunothérapies chez des patients atteints de cancers du rein métastatiques », *Rev. Francoph. Psycho-Oncol.*, vol. 4, n° 3, p. 207-217, sept. 2005.
- [81] M. T. Kinsella et C. Monk, « Impact of Maternal Stress, Depression & Anxiety on Fetal Neurobehavioral Development », *Clin. Obstet. Gynecol.*, vol. 52, n° 3, p. 425-440, sept. 2009.
- [82] P. R. Lee, D. L. Brady, R. A. Shapiro, D. M. Dorsa, et J. I. Koenig, « Prenatal Stress Generates Deficits in Rat Social Behavior », *Brain Res.*, vol. 1156, p. 152-167, juill. 2007.

- [83] J. W. Cave et H. Baker, « Dopamine Systems in the Forebrain », in *Development and Engineering of Dopamine Neurons*, R. J. Pasterkamp, M. P. Smidt, et J. P. H. Burbach, Éd. Springer New York, 2009, p. 15-35.
- [84] R. D. Oades, K. Taghzouti, J. M. Rivet, H. Simon, et M. Le Moal, « Locomotor activity in relation to dopamine and noradrenaline in the nucleus accumbens, septal and frontal areas: a 6-hydroxydopamine study », *Neuropsychobiology*, vol. 16, n° 1, p. 37-42, 1986.
- [85] R. Sugita, Y. Sawa, S. Nomura, S. H. Zorn, et T. Yamauchi, « Effects of reserpine on dopamine metabolite in the nucleus accumbens and locomotor activity in freely moving rats », *Neurochem. Res.*, vol. 14, n° 3, p. 267-270, mars 1989.
- [86] T. A. Slotkin, M. L. Kreider, C. A. Tate, et F. J. Seidler, « Critical Prenatal and Postnatal Periods for Persistent Effects of Dexamethasone on Serotonergic and Dopaminergic Systems », *Neuropsychopharmacology*, vol. 31, n° 5, p. 904-911, 2006.
- [87] S. McArthur, E. McHale, et G. E. Gillies, « The size and distribution of midbrain dopaminergic populations are permanently altered by perinatal glucocorticoid exposure in a sex- region- and time-specific manner », *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*, vol. 32, n° 7, p. 1462-1476, juill. 2007.
- [88] M. Carli, C. Prontera, et R. Samanin, « Effect of 5-HT1A agonists on stress-induced deficit in open field locomotor activity of rats: Evidence that this model identifies anxiolytic-like activity », *Neuropharmacology*, vol. 28, n° 5, p. 471-476, mai 1989.
- [89] K. Lesch *et al.*, « Organization of the Human Serotonin Transporter Gene », *J. Neural Transm.-Gen. Sect.*, vol. 95, n° 2, p. 157-162, 1994.
- [90] P. McGuffin, S. Alsbaban, et R. Uher, « The truth about genetic variation in the serotonin transporter gene and response to stress and medication », *Br. J. Psychiatry*, vol. 198, n° 6, p. 424-427, juin 2011.
- [91] D. A. Collier *et al.*, « A novel functional polymorphism within the promoter of the serotonin transporter gene: Possible role in susceptibility to affective disorders », *Mol. Psychiatry*, vol. 1, n° 6, p. 453-460, déc. 1996.
- [92] R. G. Lister, « The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse », *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 92, n° 2, p. 180-185, juin 1987.
- [93] M. S. Murmu, S. Salomon, Y. Biala, M. Weinstock, K. Braun, et J. Bock, « Changes of spine density and dendritic complexity in the prefrontal cortex in offspring of mothers exposed to stress during pregnancy », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 24, n° 5, p. 1477-1487, sept. 2006.
- [94] Y. Kagamiishi, T. Yamamoto, et S. Watanabe, « Hippocampal serotonergic system is involved in anxiety-like behavior induced by corticotropin-releasing factor », *Brain Res.*, vol. 991, n° 1-2, p. 212-221, nov. 2003.
- [95] K. S. Kraus et B. Canlon, « Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus », *Hear. Res.*, vol. 288, n° 1-2, p. 34-46, juin 2012.
- [96] M. M. Munoz-Lopez, A. Mohedano-Moriano, et R. Insausti, « Anatomical Pathways for Auditory Memory in Primates », *Front. Neuroanat.*, vol. 4, oct. 2010.
- [97] J. A. Winer et C. C. Lee, « The distributed auditory cortex », *Hear. Res.*, vol. 229, n° 1-2, p. 3-13, juill. 2007.
- [98] W. Babisch, « Cardiovascular effects of noise », *Noise Health*, vol. 13, n° 52, p. 201, 2011.
- [99] T. T. Dang-Vu, S. M. McKinney, O. M. Buxton, J. M. Solet, et J. M. Ellenbogen, « Spontaneous brain rhythms predict sleep stability in the face of noise », *Curr. Biol.*, vol. 20, n° 15, p. R626-R627, août 2010.
- [100] M. Klatte, T. Lachmann, et M. Meis, « Effects of noise and reverberation on speech perception and listening comprehension of children and adults in a classroom-like setting », *Noise Health*, vol. 12, n° 49, p. 270, 2010.
- [101] T. Campbell, S. Lin, C. DeVries, et K. Lambert, « Coping strategies in male and female rats exposed to multiple stressors », *Physiol. Behav.*, vol. 78, n° 3, p. 495-504, mars 2003.

- [102] I. S. Curthoys et G. M. Halmagyi, « Vestibular compensation: a review of the oculomotor, neural, and clinical consequences of unilateral vestibular loss », *J. Vestib. Res. Equilib. Orientat.*, vol. 5, n° 2, p. 67-107, avr. 1995.
- [103] A. S. Etienne et K. J. Jeffery, « Path integration in mammals », *Hippocampus*, vol. 14, n° 2, p. 180-192, 2004.
- [104] M. Pisa, « Motor somatotopy in the striatum of rat: Manipulation, biting and gait », *Behav. Brain Res.*, vol. 27, n° 1, p. 21-35, janv. 1988.
- [105] O. Perrot, D. Laroche, T. Pozzo, et C. Marie, « Quantitative Assessment of Stereotyped and Challenged Locomotion after Lesion of the Striatum: A 3D Kinematic Study in Rats », *PLOS ONE*, vol. 4, n° 10, p. e7616, oct. 2009.
- [106] F. L. Groeneweg, H. Karst, E. R. de Kloet, et M. Joëls, « Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response », *J. Endocrinol.*, vol. 209, n° 2, p. 153-167, mai 2011.
- [107] S. S. Daftary, J. Panksepp, Y. Dong, et D. B. Saal, « Stress-induced, glucocorticoid-dependent strengthening of glutamatergic synaptic transmission in midbrain dopamine neurons », *Neurosci. Lett.*, vol. 452, n° 3, p. 273-276, mars 2009.
- [108] N. Rasheed, A. Ahmad, C. P. Pandey, R. K. Chaturvedi, M. Lohani, et G. Palit, « Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats », *Neurochem. Res.*, vol. 35, n° 1, p. 22-32, janv. 2010.
- [109] O. Escanilla, C. Yuhas, D. Marzan, et C. Linster, « Dopaminergic modulation of olfactory bulb processing affects odor discrimination learning in rats », *Behav. Neurosci.*, vol. 123, n° 4, p. 828-833, août 2009.
- [110] A. M. Robinson, R. C. Kern, J. D. Foster, K. J. Fong, et D. Z. Pitovski, « Expression of glucocorticoid receptor mRNA and protein in the olfactory mucosa: physiologic and pathophysiologic implications », *The Laryngoscope*, vol. 108, n° 8 Pt 1, p. 1238-1242, août 1998.
- [111] H. Baker et A. I. Farbman, « Olfactory afferent regulation of the dopamine phenotype in the fetal rat olfactory system », *Neuroscience*, vol. 52, n° 1, p. 115-134, janv. 1993.
- [112] V. J. Parker et A. J. Douglas, « Stress in early pregnancy: maternal neuro-endocrine-immune responses and effects », *J. Reprod. Immunol.*, vol. 85, n° 1, p. 86-92, mai 2010.
- [113] C. C. A. Vanbesien-Mailliot *et al.*, « Prenatal stress has pro-inflammatory consequences on the immune system in adult rats », *Psychoneuroendocrinology*, vol. 32, n° 2, p. 114-124, févr. 2007.
- [114] R. Dantzer, E. E. Wollmann, et R. Yirmiya, *Cytokines, Stress, and Depression*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [115] C. Sandi, J. C. Cambroner, J. Borrell, et C. Guaza, « Effects of HPA hormones on adapted lymphocyte responsiveness to repeated stress », *Brain Res. Bull.*, vol. 28, n° 4, p. 581-585, avr. 1992.
- [116] S. E. P. Smith, J. Li, K. Garbett, K. Mirnics, et P. H. Patterson, « Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6 », *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.*, vol. 27, n° 40, p. 10695-10702, oct. 2007.
- [117] A. Raynaud, N. Meunier, A. Acquistapace, et V. Bombail, « Chronic variable stress exposure in male Wistar rats affects the first step of olfactory detection », *Behav. Brain Res.*, vol. 291, p. 36-45, sept. 2015.
- [118] H. Maeyama *et al.*, « Maternal restraint stress during pregnancy in mice induces 11 $\beta$ -HSD1-associated metabolic changes in the livers of the offspring », *J. Dev. Orig. Health Dis.*, vol. 6, n° 2, p. 105-114, avr. 2015.
- [119] J. Li, J. Olsen, M. Vestergaard, C. Obel, J. L. Baker, et T. I. A. Sørensen, « Prenatal stress exposure related to maternal bereavement and risk of childhood overweight », *PloS One*, vol. 5, n° 7, p. e11896, juill. 2010.
- [120] M. J. Nyirenda, R. S. Lindsay, C. J. Kenyon, A. Burchell, et J. R. Seckl, « Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and

- glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring », *J. Clin. Invest.*, vol. 101, n° 10, p. 2174-2181, mai 1998.
- [121] J. Capeau, J.-P. Bastard, et C. Vigouroux, « Syndrome métabolique et insulino-résistance : physiopathologie », *MT Cardio*, vol. 2, n° 2, p. 155-164, mars 2006.
- [122] B. Vergès, « Physiopathologie de la dyslipidémie du syndrome métabolique et du diabète de type 2 », *Nutr. Clin. Métabolisme*, vol. 21, n° 1, p. 9-16, mars 2007.
- [123] L. Duvallard *et al.*, « Cell surface expression of LDL receptor is decreased in type 2 diabetic patients and is normalized by insulin therapy », *Diabetes Care*, vol. 26, n° 5, p. 1540-1544, mai 2003.
- [124] N. M. Morton et J. R. Seckl, « 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and obesity », *Front. Horm. Res.*, vol. 36, p. 146-164, 2008.
- [125] J. W. Tomlinson *et al.*, « 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific regulator of glucocorticoid response », *Endocr. Rev.*, vol. 25, n° 5, p. 831-866, oct. 2004.
- [126] J. Maniam, C. Antoniadis, et M. J. Morris, « Early-Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes », *Front. Endocrinol.*, vol. 5, 2014.
- [127] C. Gälman, B. Angelin, et M. Rudling, « Prolonged stimulation of the adrenals by corticotropin suppresses hepatic low-density lipoprotein and high-density lipoprotein receptors and increases plasma cholesterol », *Endocrinology*, vol. 143, n° 5, p. 1809-1816, mai 2002.
- [128] S. Sun, S. Yang, Y. Mao, X. Jia, et Z. Zhang, « Reduced cholesterol is associated with the depressive-like behavior in rats through modulation of the brain 5-HT1A receptor », *Lipids Health Dis.*, vol. 14, mars 2015.
- [129] D. De Berardis *et al.*, « The Relationships between Cholesterol and Suicide: An Update », *Int. Sch. Res. Not.*, vol. 2012, p. e387901, déc. 2012.
- [130] « File: Steroidogenesis.svg », *Wikipedia*. 20-nov-2012.
- [131] J. C. Alvarez *et al.*, « Low blood cholesterol and low platelet serotonin levels in violent suicide attempters », *Biol. Psychiatry*, vol. 45, n° 8, p. 1066-1069, avr. 1999.
- [132] P. H. Steegmans, D. Fekkes, A. W. Hoes, A. A. Bak, E. van der Does, et D. E. Grobbee, « Low serum cholesterol concentration and serotonin metabolism in men. », *BMJ*, vol. 312, n° 7025, p. 221, janv. 1996.
- [133] H. Engelberg, « Low serum cholesterol and suicide », *Lancet Lond. Engl.*, vol. 339, n° 8795, p. 727-729, mars 1992.
- [134] M. Maes *et al.*, « Lower serum high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in major depression and in depressed men with serious suicidal attempts: relationship with immune-inflammatory markers », *Acta Psychiatr. Scand.*, vol. 95, n° 3, p. 212-221, mars 1997.
- [135] W. A. Rogers et B. H. Ruebner, « A retrospective study of probable glucocorticoid-induced hepatopathy in dogs », *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, vol. 170, n° 6, p. 603-606, mars 1977.
- [136] H. Jia *et al.*, « Chronic unpredictable mild stress leads to altered hepatic metabolic profile and gene expression », *Sci. Rep.*, vol. 6, p. 23441, mars 2016.
- [137] V. Van Waes *et al.*, « Effect of prenatal stress on alcohol preference and sensitivity to chronic alcohol exposure in male rats », *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 214, n° 1, p. 197-208, mars 2011.
- [138] S. Zelber-Sagi *et al.*, « Elevated alanine aminotransferase independently predicts new onset of depression in employees undergoing health screening examinations », *Psychol. Med.*, vol. 43, n° 12, p. 2603-2613, déc. 2013.
- [139] P. J. Neveu et R. Dantzer, « Cytokines et cerveau », *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, vol. 36, n° 3, p. 319-326, mai 1996.
- [140] L. F. Perrin, *Psychisme, le stress et l'immunité (Le): La santé est en nous !* Odile Jacob, 2003.
- [141] H. Friedman, T. W. Klein, et A. L. Friedman, *Psychoneuroimmunology, Stress, and Infection*. CRC Press, 1995.
- [142] S. Hayley, « The neuroimmune-neuroplasticity interface and brain pathology », *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 8, déc. 2014.

- [143] J. M. Bakker *et al.*, « Effects of short-term dexamethasone treatment during pregnancy on the development of the immune system and the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the rat », *J. Neuroimmunol.*, vol. 63, n° 2, p. 183-191, déc. 1995.
- [144] T. L. Roszman et W. H. Brooks, « Interactive signaling pathways of the neuroendocrine-immune network », *Chem. Immunol.*, vol. 69, p. 203-222, 1997.
- [145] I. J. Elenkov, R. L. Wilder, G. P. Chrousos, et E. S. Vizi, « The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system », *Pharmacol. Rev.*, vol. 52, n° 4, p. 595-638, déc. 2000.
- [146] H. Miyazaki et M. Kinoshita, « Stress-induced immunosuppression and physical performance », *J. Phys. Fit. Sports Med.*, vol. 4, n° 3, p. 295-298, 2015.
- [147] M. Fleshner, D. Bellgrau, L. R. Watkins, M. L. Laudenslager, et S. F. Maier, « Stress-induced reduction in the rat mixed lymphocyte reaction is due to macrophages and not to changes in T cell phenotypes », *J. Neuroimmunol.*, vol. 56, n° 1, p. 45-52, janv. 1995.
- [148] M. R. Shurin, D. Zhou, A. Kusnecov, S. Rassnick, et B. S. Rabin, « Effect of one or more footshocks on spleen and blood lymphocyte proliferation in rats », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 8, n° 1, p. 57-65, mars 1994.
- [149] C. P. Fagundes, R. Glaser, B. S. Hwang, W. B. Malarkey, et J. K. Kiecolt-Glaser, « Depressive symptoms enhance stress-induced inflammatory responses », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 31, p. 172-176, juill. 2013.
- [150] P. G. Wood, M. H. Karol, A. W. Kusnecov, et B. S. Rabin, « Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 7, n° 2, p. 121-134, juin 1993.
- [151] E. Merlot, D. Couret, et W. Otten, « Prenatal stress, fetal imprinting and immunity », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 22, n° 1, p. 42-51, janv. 2008.
- [152] J. M. Suls, K. W. Davidson, et R. M. Kaplan, *Handbook of Health Psychology and Behavioral Medicine*. Guilford Press, 2011.
- [153] R. J. Ruiz et K. C. Avant, « Effects of maternal prenatal stress on infant outcomes: a synthesis of the literature », *ANS Adv. Nurs. Sci.*, vol. 28, n° 4, p. 345-355, déc. 2005.
- [154] Y. Diz-Chaves, M. Astiz, M. J. Bellini, et L. M. Garcia-Segura, « Prenatal stress increases the expression of proinflammatory cytokines and exacerbates the inflammatory response to LPS in the hippocampal formation of adult male mice », *Brain. Behav. Immun.*, vol. 28, p. 196-206, févr. 2013.
- [155] P. J. Barnes, « How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005 », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 148, n° 3, p. 245-254, juin 2006.
- [156] T. Wilckens et R. De Rijk, « Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers », *Immunol. Today*, vol. 18, n° 9, p. 418-424, sept. 1997.
- [157] M.-A. Bellavance et S. Rivest, « The HPA – Immune Axis and the Immunomodulatory Actions of Glucocorticoids in the Brain », *Front. Immunol.*, vol. 5, mars 2014.
- [158] P. J. Barnes, « Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation », *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 120, n° 2-3, p. 76-85, mai 2010.
- [159] P. J. Barnes, « Glucocorticosteroids: current and future directions », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 163, n° 1, p. 29-43, mai 2011.
- [160] A. Bierhaus *et al.*, « A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, n° 4, p. 1920-1925, févr. 2003.
- [161] N. Quan *et al.*, « Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock », *J. Neuroimmunol.*, vol. 115, n° 1-2, p. 36-45, avr. 2001.
- [162] S. Schiavone, V. Jaquet, L. Trabace, et K.-H. Krause, « Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 18, n° 12, p. 1475-1490, avr. 2013.

- [163] D. Costantini, V. Marasco, et A. P. Møller, « A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates », *J. Comp. Physiol. [B]*, vol. 181, n° 4, p. 447-456, mai 2011.
- [164] M. Hosseini-sharifabad, E. Esfandiari, et A. Hosseini-sharifabad, « The Effect of Prenatal Exposure to Restraint Stress on Hippocampal Granule Neurons of Adult Rat Offspring », *Iran. J. Basic Med. Sci.*, vol. 15, n° 5, p. 1060-1067, 2012.
- [165] L. Song *et al.*, « Prenatal Stress Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Hippocampus of Offspring Rats », *Neurochem. Res.*, vol. 34, n° 4, p. 739-745, avr. 2009.
- [166] T. Marumo, V. B. Schini-Kerth, R. P. Brandes, et R. Busse, « Glucocorticoids inhibit superoxide anion production and p22 phox mRNA expression in human aortic smooth muscle cells », *Hypertens. Dallas Tex 1979*, vol. 32, n° 6, p. 1083-1088, déc. 1998.
- [167] J. Bouayed, H. Rammal, et R. Soulimani, « Oxidative stress and anxiety », *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2, n° 2, p. 63-67, 2009.
- [168] E. Bouvier, *BDNF et stress oxydant : deux acteurs majeurs de la vulnérabilité à la dépression*. Paris 6, 2012.
- [169] J. Zou et F. Crews, « CREB and NF-kappaB transcription factors regulate sensitivity to excitotoxic and oxidative stress induced neuronal cell death », *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 26, n° 4-6, p. 385-405, août 2006.
- [170] G. Laviola *et al.*, « Beneficial effects of enriched environment on adolescent rats from stressed pregnancies », *Eur. J. Neurosci.*, vol. 20, n° 6, p. 1655-1664, sept. 2004.
- [171] B. Schöbitz, W. Sutanto, M. P. Carey, F. Holsboer, et E. R. de Kloet, « Endotoxin and interleukin 1 decrease the affinity of hippocampal mineralocorticoid (type I) receptor in parallel to activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis », *Neuroendocrinology*, vol. 60, n° 2, p. 124-133, août 1994.
- [172] A. Barbazanges, P. V. Piazza, M. L. Moal, et S. Maccari, « Maternal Glucocorticoid Secretion Mediates Long-Term Effects of Prenatal Stress », *J. Neurosci.*, vol. 16, n° 12, p. 3943-3949, juin 1996.
- [173] D. M. Araujo, P. A. Lapchak, B. Collier, et R. Quirion, « Localization of interleukin-2 immunoreactivity and interleukin-2 receptors in the rat brain: interaction with the cholinergic system », *Brain Res.*, vol. 498, n° 2, p. 257-266, oct. 1989.
- [174] D. Meola, Z. Huang, et J. M. Petitto, « Selective Neuronal and Brain Regional Expression of IL-2 in IL2P8-GFP Transgenic Mice: Relation to Sensorimotor Gating », *J. Alzheimers Dis. Park.*, vol. 3, n° 4, p. 1000127, oct. 2013.
- [175] C. Rivier, « Influence of immune signals on the hypothalamic-pituitary axis of the rodent », *Front. Neuroendocrinol.*, vol. 16, n° 2, p. 151-182, avr. 1995.
- [176] E. A. Korneva, S. V. Barabanova, O. I. Golovko, M. A. Nosov, N. S. Novikova, et T. B. Kazakova, « C-fos and IL-2 Gene Expression in Rat Brain Cells and Splenic Lymphocytes after Nonantigenic and Antigenic Stimuli », *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 917, n° 1, p. 197-209, janv. 2000.
- [177] M. Prinz, D. V. Rossum, et U.-K. Hanisch, « Interleukin-2 as a Neuroregulatory Cytokine », in *NeuroImmune Biology*, vol. 6, P. and Korneva, Éd. Elsevier, 2008, p. 145-165.
- [178] L. Capuron, A. Ravaud, et R. Dantzer, « Early depressive symptoms in cancer patients receiving interleukin 2 and/or interferon alfa-2b therapy », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 18, n° 10, p. 2143-2151, mai 2000.
- [179] C. Jacque et J.-M. Thurin, « Stress, immunité et physiologie du système nerveux », *médecine/sciences*, vol. 18, n° 11, p. 1160-1166, nov. 2002.
- [180] B. D. Karrenbauer *et al.*, « Time-dependent in-vivo effects of interleukin-2 on neurotransmitters in various cortices: relationships with depressive-related and anxiety-like behaviour », *J. Neuroimmunol.*, vol. 237, n° 1-2, p. 23-32, août 2011.
- [181] U. K. Hanisch, J. Neuhaus, R. Quirion, et H. Kettenmann, « Neurotoxicity induced by interleukin-2: involvement of infiltrating immune cells », *Synap. N. Y. N.*, vol. 24, n° 2, p. 104-114, oct. 1996.

- [182] P. J. Waguespack, W. A. Banks, et A. J. Kastin, « Interleukin-2 does not cross the blood-brain barrier by a saturable transport system », *Brain Res. Bull.*, vol. 34, n° 2, p. 103-109, 1994.
- [183] V. K. Singh, « Stimulatory effect of corticotropin-releasing neurohormone on human lymphocyte proliferation and interleukin-2 receptor expression », *J. Neuroimmunol.*, vol. 23, n° 3, p. 257-262, août 1989.
- [184] C. Buss, S. Entringer, et P. D. Wadhwa, « Fetal Programming of Brain Development: Intrauterine Stress and Susceptibility to Psychopathology », *Sci. Signal.*, vol. 5, n° 245, oct. 2012.
- [185] S. Campbell et G. MacQueen, « The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression », *J. Psychiatry Neurosci.*, vol. 29, n° 6, p. 417-426, nov. 2004.
- [186] H. B. M. Uylings, H. J. Groenewegen, et B. Kolb, « Do rats have a prefrontal cortex? », *Behav. Brain Res.*, vol. 146, n° 1-2, p. 3-17, nov. 2003.

# **ANNEXES**

## LISTE DES COMMUNICATIONS

### Communication orale :

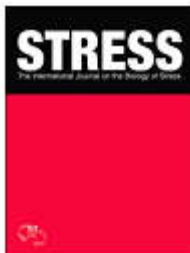
- **L'impact d'un stress acoustique prénatal sur le comportement explorateur, la motricité et la capacité d'équilibration chez le rat Wistar albinos.** III<sup>ème</sup> congrès international de biotechnologie et valorisation des bioressources (AT-BVBR), 20-23 Mars 2015, Tabarka, Tunisie.

### Communications par affiche :

- **Pollution sonore et effet de la supplémentation diététique en extrait de levure sur le système immunitaire pendant la gestation des rattes Wistar albinos.** The first international congress of nutrition and food science: From bench to beside. 20-22 Novembre 2015. Université de Tlemcen. Algérie.
- **Stress prénatal : Altération de la locomotion, la balance et surexpression des récepteurs centraux à IL2 dans le cortex moteur et le striatum.** 28<sup>ème</sup> forum international des sciences biologiques et de biotechnologie (ATSB), 21-23 Mars 2017. Hammamet, Tunisie.

## PUBLICATION

Soumeya Badache, Slim Bouslama, Oualid Brahmia, Abdel Madjid Baïri, Abdel Krim Tahraoui & Ali Ladjama (2017): **Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects**, Stress, DOI: 10.1080/10253890.2017.1307962. (Impact Factor 2015: 2.38).



Stress

The International Journal on the Biology of Stress



ISSN: 1025-3890 (Print) 1607-8888 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/ists20>

## Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects

Soumeya Badache, Slim Bouslama, Oualid Brahmia, Abdel Madjid Baïri, Abdel Krim Tahraoui & Ali Ladjama

To cite this article: Soumeya Badache, Slim Bouslama, Oualid Brahmia, Abdel Madjid Baïri, Abdel Krim Tahraoui & Ali Ladjama (2017): Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects, *Stress*, DOI: [10.1080/10253890.2017.1307962](https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1307962)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10253890.2017.1307962>



Accepted author version posted online: 19 Mar 2017.  
Published online: 21 Apr 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 25



View related articles [↗](#)

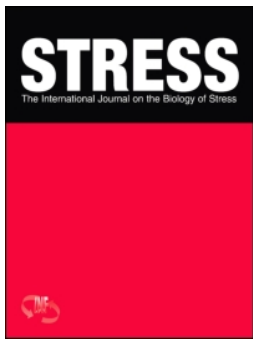


View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at  
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=ists20>

Download by: [SOUMEYA BADACHE]

Date: 07 May 2017, At: 08:09



## Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects

Soumeya Badache, Slim Bouslama, Oualid Brahmia, Abdel Madjid Baïri, Abdel Krim Tahraoui & Ali Ladjama

To cite this article: Soumeya Badache, Slim Bouslama, Oualid Brahmia, Abdel Madjid Baïri, Abdel Krim Tahraoui & Ali Ladjama (2017): Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects, *Stress*, DOI: [10.1080/10253890.2017.1307962](https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1307962)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10253890.2017.1307962>



Accepted author version posted online: 19 Mar 2017.

Published online: 21 Apr 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 25



View related articles [↗](#)









View Crossmark data [↗](#)

ORIGINAL RESEARCH REPORT



## Prenatal noise and restraint stress interact to alter exploratory behavior and balance in juvenile rats, and mixed stress reverses these effects

Soumeya Badache<sup>a</sup> , Slim Bouzlama<sup>b</sup> , Oualid Brahmia<sup>c</sup> , Abdel Madjid Bairi<sup>d</sup> , Abdel Krim Tahraoui<sup>d</sup>  and Ali Ladjama<sup>a</sup> 

<sup>a</sup>Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University Badji Mokhtar-Annaba, Algeria; <sup>b</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Science, University Badji Mokhtar-Annaba, Algeria; <sup>c</sup>Department of Medicine, Faculty of Medical Sciences, University Badji Mokhtar-Annaba, Algeria; <sup>d</sup>Laboratory of Applied Neuroendocrinology, Department of Biology, Faculty of Science, University Badji Mokhtar-Annaba, Algeria

### ABSTRACT

We aimed to investigate in adolescent rats the individual and combined effects of prenatal noise and restraint stress on balance control, exploration, locomotion and anxiety behavior. Three groups of pregnant rats were exposed to daily repeated stress from day 11 to day 19 of pregnancy: 3 min noise (Noise Stress, NS); 10 min restraint (restraint stress, RS); or 3 min noise followed by 10 min restraint (mixed stress, MS). On postnatal days (PND) 44, 45 and 46, four groups of male rats (Control, NS, RS; MS; 16 rats each), were tested as follows: (1) beam walking (BW), (2) open field (OF) and (3) elevated plus maze (EPM). Our results show that the NS group had significantly impaired balance control, locomotion and both horizontal and vertical exploration ( $p < .01$  for all measures). The RS group showed only a decrease in vertical exploration ( $p < .05$ ). In contrast, locomotion and balance were not affected in the MS group (OF: crossed squares:  $p = .34$ , missteps:  $p = .18$ ). However, MS rats exhibited significantly higher anxiety levels (less time in EPM open arms:  $p < .05$ ), and took more time to complete BW:  $p < .05$ ). Hence, combined prenatal stressors exert non-additive effects on locomotion, exploration and balance control, but induce greater anxiety through additive effects. Terminal plasma ACTH concentration was increased by prenatal stress, especially noise, which group had the largest adrenal glands. Overall, contrary to expectation, combined prenatal stressors can interact to increase anxiety level, but diminish alteration of exploration, locomotion and impaired balance control, which were strongly induced by noise stress.

**Lay summary:** Experience of stress in pregnancy can have negative effects on the offspring that are long-lasting. Here, we used laboratory rats to see whether repeated episodes of exposure to loud noise or preventing free movement, alone or together, during pregnancy had different effects on behaviors of the adolescent offspring. Using standard tests, we found the prenatal stresses caused the offspring to be anxious, and not to balance when moving around as well as normal offspring; the degree of impairment depended on the type of stress – loud noise exposure had the greatest effects, but if the stresses were combined the effects were not worse. The results point to the need to aim to avoid stress in pregnant women.

### ARTICLE HISTORY

Received 22 October 2016  
Accepted 14 March 2017

### KEYWORDS

Anxiety; balance; beam walking; locomotion; noise; prenatal stress

## Introduction

Over the past few decades, many studies have focused on the short-term effects of prenatal stress on fetal development in both animal and human models (Cao-Lei et al., 2015; Zeng et al., 2015). Indeed, it has been reported that prenatal exposure to stress causes neurophysiological (Caspi et al., 2010), cognitive and behavioral disorders (Cabrera et al., 1999) in offspring, such as spatial memory disorders (Benoit et al., 2015) development of anxiety-or depression-like behavior (Basner et al., 2014; Weinstock, 2008).

It has been hypothesized that epigenetic mechanisms represent the interface through which the environment acts to modify the expression of genes and, at the same time, induces behavioral changes (Zheng et al., 2016). Thus, major traumatic events in life such as loss of a spouse or experiencing

armed conflict (Appart et al., 2016), has been associated with post-traumatic stress disorder (PTSD) (Yehuda et al., 2005) and increased incidence of schizophrenia in the offspring of pregnant women, particularly those traumatized in the first trimester of pregnancy (van Os & Selten, 1998). Indeed, several studies on rats have concluded that prenatal stress alters memory, learning and exploration, with development of anxiety- or depression-like behavior (Babri et al., 2014; Cabrera et al., 1999). However, results of studies on prenatal stress in animals are sometimes contradictory, with Meek et al. (2000) showing that 12-day-old mice born to mothers stressed during the last week of gestation exhibited more intense exploratory capacity than the control.

Several important questions arise from these studies, such as how does exposure to events that occur during the

perinatal period affect behavior (exploration, locomotion and anxiety-like behavior) later in life?; When various different stressors are applied simultaneously, is the effect similar to a sum-of-effects of the individually-applied stressors? and can these stressors act synergistically or antagonistically to modify behavior in juvenile rats? In order to answer these questions, we investigated the impact of prenatal exposure to two types of stressor, namely sound stress and restraint stress, alone and as a combination of both. Environmental noise (vehicles, work environment) is usually not threatening, but it may represent a considerable subjective annoyance and act as a stressor, leading to psychosomatic disturbances (Haüsler 2004). For this reason, we aimed to investigate the effects of chronic short exposure to high decibel noise of the mother during pregnancy to mimic natural exposure to a high level environmental noise (e.g. vehicle horns, aircraft noise). Here, restraint stress was selected as a model of emotional prenatal stress on the basis of previous studies reporting that gestational restraint stress induces long-lasting neurobiological and behavioral alterations (Maccari & Morley-Fletcher, 2007).

We evaluated anxiety like-behavior, exploratory behavior, locomotor performance and balance control in adolescent rats. Balance control appears to have received little attention in the field of stress, yet prenatal stress exposure is likely to significantly influence balance control. Nazeri et al. (2015) reported that balance and motor function were impaired in prenatally stressed juvenile female rats. A study on non-human primates found that strong exposure to prenatal stress resulted in reduced motor activity and poorer balance in the exposed offspring (Schneider & Coe, 1993). In particular, the effect of simultaneous exposure to different stressors during intrauterine life on balance control has not been studied.

Thus, a novel aspect of the present study is the testing of locomotor functions in the form of balance control. We also investigated whether prenatal noise and restraint stress interact and how this interaction impacts exploration and locomotion, as well as on balance control of juvenile rats. Overall, the goal of the present study was to determine the extent to which prenatal noise and restraint stress, applied individually, impacted exploratory behavior, locomotor performance and balance control functioning in juvenile male rats, and how these prenatal stressors interact to modify behavior when applied together.

## Methods

### Animals

Test subjects were 24 90-day-old virgin female rats (Wistar albino strain provided by Pasteur Institute-Algiers, Algeria), weighing  $200 \pm 20$  g at the beginning of the study. Rats were housed in PVC cages in a colony room (Department of Biology, University of Annaba, Algeria) and kept under standard laboratory conditions of  $25 \pm 2$  °C, 50% relative humidity and artificial lighting, 12 h light/12 h dark starting at 07h00. Food (standard rat chow from ONAB-El Kseur, Béjaïa, Algeria), and water were provided *ad libitum*. Unnecessary manipulations (i.e. apart from cage cleaning) were avoided.

### Experimental protocols

In order to synchronize estrous cycles in the female rats, two males of the same strain and four female rats were put into a partitioned cage with no physical contact for 7 days, allowing exposure to male pheromones. Males and females were then separated for 7 days before pairs of females were caged with one of the males for copulation. Vaginal smears were analyzed daily and observation of sperm was considered day 0 of pregnancy. Males were then removed and pregnant females were separated into experimental groups with two rats per cage: noise stress (NS),  $n = 6$ ; restraint stress (RS)  $n = 6$ ; mixed stress (MS)  $n = 6$ ; and control (C)  $n = 8$ . Pregnant females were separated into individual cages on day 17 as the end of pregnancy approached.

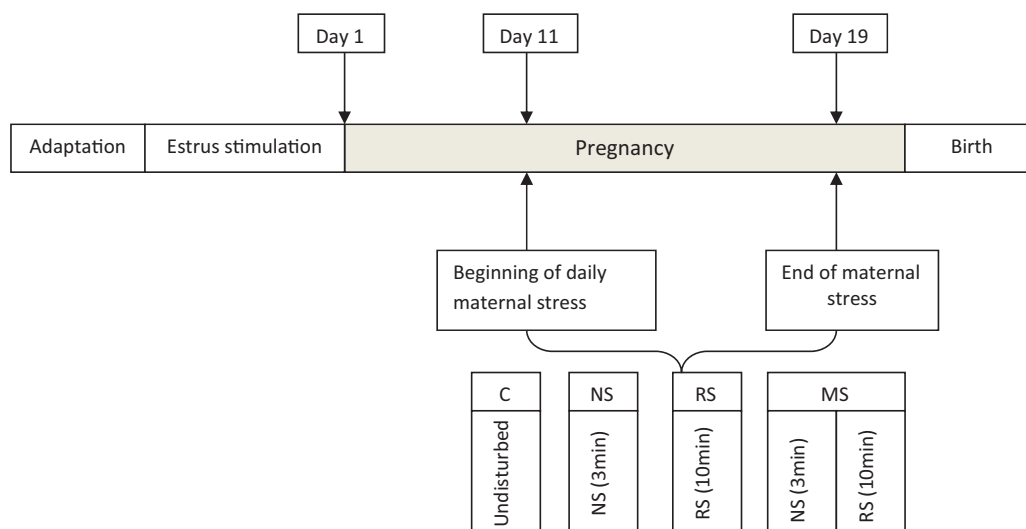
Seventy-two hours after delivery, prenatally stressed and control offspring were sexed and weighed (data not shown), before being returned to their own dams to nurse undisturbed under the standard laboratory conditions described above. After day 30 post-partum, female rats in the progeny were excluded from our experiments (because the aim of this study was not investigation of sex-biased responses to stressors) and 16 males were selected randomly from each group of surviving rats (Control:  $n = 16$ , NS:  $n = 16$ , RS:  $n = 16$ , and MS:  $n = 16$ ). All 16 rats of each group were subjected to behavioral tests to assess anxiety levels, locomotor and exploratory behavior and balance ability. It is important to note that all rats were kept undisturbed until post-natal day (PND) 30 before being divided into four groups of 16 rats (C, NS, RS and MS groups; eight rats per cage). Behavioral test sessions were performed with 24-h intervals between each test to avoid acute stress-induced interference with the outcome of the subsequent test. Blood sampling was performed to measure plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) concentrations after 48 h of behavioral assessment to assess whether hormonal responses had returned to baseline levels. All experimental procedures described in this work are in accordance with the Guide of Care and Use of Laboratory Animals of the University of Badji Mokhtar Annaba, Algeria.

### Maternal treatments

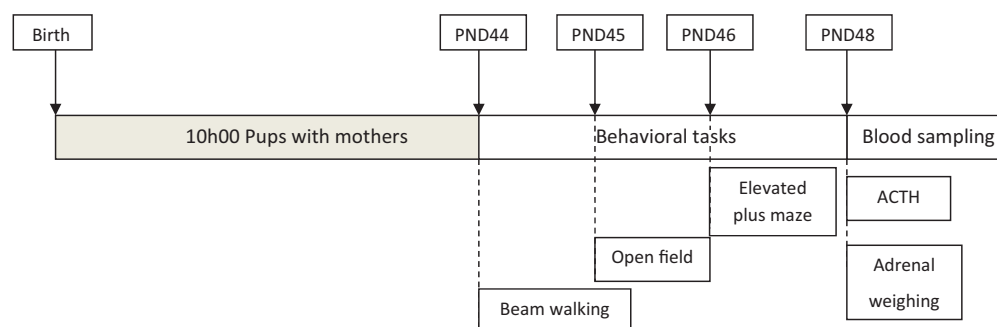
Experimental groups were exposed to a daily, short stress session (NS, RS, MS) between 08h00–10h00 from day 11 to day 19 of pregnancy. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors are expressed in the developing rat brain on days 13–16 (Diaz et al., 1998). All maternal treatments, from the adaptation period until the end of pregnancy, are described in the protocol timeline (Figure 1).

### Noise stress

Auditory stimulation was provided for 3 min per day, between 08h00 and 10h00 over a period of 9 days. Noise was generated by a HELLA twintone Horn, Japan, (110 dB output at 500 Hz, 12V), fixed to the middle of the roof of the box. The sound pressure of  $110 \pm 3$  dB (A) inside the box was confirmed with a sound level meter (Trotec B S06, France, measuring range: 40 to 130 dB and 31.5 Hz to 8 kHz). In order to



**Figure 1.** Timeline of the maternal treatment protocol. C (control group); rats of this group were left undisturbed. NS (noise stress group); females were exposed to daily sessions of noise stress for 3 min. RS (restraint stress group); females were restrained daily for 10 min. MS (mixed stress group); females were exposed to noise for 3 min, followed by 10 min of restraint. Stress sessions were administered daily from day 11 of pregnancy until day 19 between 08h00 and 10h00.



**Figure 2.** Timeline of the progeny treatment protocol. All male rats were kept undisturbed until postnatal day (PND) 44 when they began performing the following behavioral tasks between 08h00 and 10h00: the Beam Walking (BW) test on PND44, Open Field (OF) test on PND45, and Elevated Plus Maze test (EPM) on PND46. Blood samples were taken and adrenal glands were weighed on PND48 at 08h00.

assess the effects of prenatal exposure of high decibel noise on rats, it is a prerequisite that the frequency range of the stimulus should be within the range that the test species naturally communicates and hears. Here, the horn emitted a pure tone of 500 Hz. Noise was applied individually to rats placed in a box (20 cm × 30 cm × 30 cm) made of thick glass (1 cm) fitted with a ventilated top. Noise induction was applied in a room separate from the colony room where rats were housed.

### Restraint stress

To induce chronic restraint stress, rats were restrained in individual opaque plastic cylinders (14.5 cm in length, 5.5 cm in diameter). The cylinder was fenestrated to allow equilibration of temperature and gases with the ambient air. Rats were restrained daily for 10 min, over a period of 9 days, between 08h00 and 10h00. During stress sessions, rats had no access to water or food.

### Mixed stress combining noise and restraint stress

Rats were subjected to noise stress (as described) for 3 min, followed by restraint for 10 min (as described above) after a 5 min interval.

### Neurobehavioral tests

Behavioral tests were performed in the following order: beam walking (BW) on PND44, open field test (OF) on PND 45 and elevated plus maze (EPM) on PND 46. All tests were conducted in a quiet room, following 20 min of habituation to the test room, during the light period (between 10h00 and 12h00). After behavior assessment, rats were returned to the colony room. All protocols of progeny manipulation are described in Figure 2.

### Balance test: beam-walking (BW)

The runway used in the locomotor task was a wooden beam, 150 cm long and 4 cm wide on the running surface, elevated 60 cm above a table by a wooden support structure (Pisa, 1988a). Video recordings of beam running were recorded and analyzed in slow-motion playback. Two parameters were recorded: (1) time to cross the beam; and (2) number of mis-steps in each trial (either footfalls outside the beam or when a rat's paw extended over the narrow beam). The analysis was conducted blind to the group identity of the rats. Measures were also taken of the mean beam running time (in seconds) within each group. The beam walking test was

conducted on PND 44, before OF and EPM tests, because of its sensitivity to stress.

### **Open field (OF)**

Following the model of Hall (1934), we used a device comprising a square-shaped floor (100 cm × 100 cm), divided by black lines into 16 squares of equal size (25 cm × 25 cm); 12 peripheral squares and 4 in the center. The floor was protected by 30 cm high transparent Plexiglas walls.

This test evaluates both locomotor activity (number of squares crossed, i.e. whenever a rat entered a new square with all four legs) and exploratory behavior (time spent in a corner versus time spent in the center for horizontal exploration, and time spent rearing on hind legs for vertical exploration). 20 min prior to test exposure, rats were moved to the test room for habituation, but remained in their home cages. After habituation, individual rats were placed into the center of the open field and their behavior was recorded for 5 min by video camera (Sony Steady Shot, Carl Zeiss, 14.1 MP, 26 mm). The apparatus was cleaned with 10% ethanol after each test.

### **Elevated plus maze (EPM)**

The EPM test, which is a well-known paradigm for testing anxiety levels in laboratory rodents, consisted of two open arms (50 cm × 10 cm) crossed at right angles with two closed arms (50 cm × 10 cm, surrounded by 40-cm high Plexiglas walls). The apparatus was raised 50 cm above the floor. Rats were placed at the center of the maze, facing one of the closed arms and their behavior was video-recorded for 5 min. Rearing time and the time spent in both the open and closed arms were recorded. The percentage time in open arms [OAT % = (time spent in open arms × 100)/(closed arms time + open arms time)] and percentage time in closed arms [CAT % = (time spent in open arms × 100)/(closed arms time + open arms time)] were calculated. Rats spend less time in the open arms of the maze when they are afraid or anxious (Pellow & File, 1986). To minimize olfactory stimuli, the maze was cleaned with a 10% ethanol solution between sessions.

### **Blood sampling**

On PND48, blood sampling was conducted in the early morning at 08h00. Terminal blood collection was performed from the venous sinus by penetrating the retro-orbital plexus with a capillary tube (Diehl et al., 2001), after ensuring that each rat was under deep general anesthesia with chloroform as inhaled anesthetic. A clean cotton ball was soaked in chloroform and kept under a desiccator with a tightly-closed lid into which each rat was placed. Depth of anesthesia was assessed by testing withdrawal reflexes after approximately 40 s following exposure. Blood collected in EDTA containers was used for analysis of ACTH plasma concentrations.

### **Plasma ACTH assay**

Blood was centrifuged at 1730 g for 15 min and circulating concentrations of ACTH were evaluated using the Sandwich

Enzyme-linked Immunosorbent Assay according to the manufacturer's protocol (ACTH ELISA Kit, Sigma-Aldrich, USA). ACTH plasma concentrations were measured using a COBAS e 411 analyzer; assay detection limit was <1 pg/ml, intra-assay coefficient of variation was 6.7%.

### **Relative weight of adrenal glands**

After blood collection, 16 rats in each group were euthanized and their adrenal glands were removed, trimmed of fat and weighed. Relative weight of adrenal glands was calculated as follows: actual adrenal weight/actual body weight (Pankakoski & Tähkä, 1982). Relative weight of adrenal glands was determined to investigate the chronic effects of our stress model on adrenal hypertrophy.

### **Statistical analysis**

Data were analyzed using the statistical package Minitab® (version 16.0) to compare between-groups differences in ACTH concentrations and behaviors. Preliminary one-way ANOVA was performed to assess differential effects of prenatal stress. When a main effect of prenatal stress on ACTH, relative adrenal weights and behavioral variables was detected ( $p < .05$ ), appropriate *post hoc* analysis was performed to evaluate significant differences. Dunnett's *post hoc* test was performed for comparison with the control group, and Tukey's test for multiple comparisons. All results are presented as the arithmetic mean ( $X$ ) ± standard error of the mean ( $X \pm SEM$ ). For all statistical analyses, a  $p$  value of less than .05 was considered as the significance level.

## **Results**

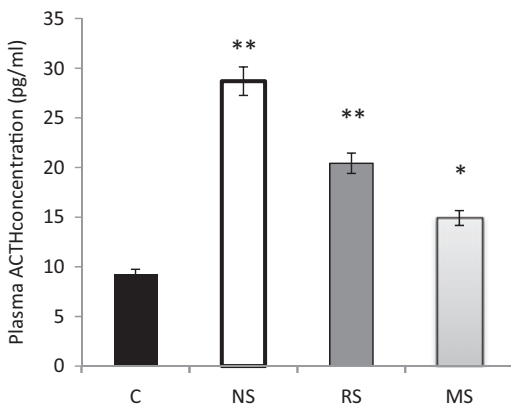
### **Plasma ACTH concentrations**

ACTH concentrations (Figure 3) were assayed on PND 48 in all groups. Preliminary one-way ANOVA revealed a significant between-group difference in plasma ACTH concentration ( $p = .001$ ,  $F(3,63) = 8.91$ ). Figure 3 shows that ACTH concentrations were highest in NS rats and significantly different from control (Dunnett's test:  $p = .002$ ,  $F(1,31) = 17.32$ ), and also high in RS rats and also significantly different from control ( $p = .004$ ,  $F(1,31) = 12.80$ ). In the MS group, plasma ACTH concentrations were significantly lower than for the NS group (Tukey's test:  $p = .016$ ,  $F(1,31) = 8.32$ ), but significantly higher than the control (Dunnett's test:  $p = .034$ ,  $F(1,31) = 2.79$ ).

### **Relative weights of adrenal glands**

Statistical analysis revealed significant effect of prenatal stress on relative weights the adrenal glands ( $p = .048$ ,  $F(3,63) = 3.29$ ). Pairwise comparison using one-way ANOVA indicated that relative weights of adrenal glands only differed between NS and control rats (Dunnett's test:  $p = .049$ ,  $F(1,31) = 5.36$ ). Relative adrenal gland weights were not significantly different between either RS or MS versus control (Dunnett's test: RS vs Control,  $p = .16$ ,  $F(1,31) = 2.35$ ; MS vs

Control,  $p = .132$ ,  $F(1,31) = 2.82$ ). Hypertrophy of adrenal glands was only detected in the NS group. Actual body weights and actual and relative adrenal gland weights are given in Table 1.



**Figure 3.** Effect of prenatal stress on ACTH concentrations (pg/ml) in control (C), noise stress (NS), restraint stress (RS) and mixed stress (MS) groups (expressed as Mean  $\pm$  SEM) and compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (Number of rats per group = 16). \*Indicates  $p$  value is  $< .05$  vs control. \*\*Indicates  $p$  value is  $< .01$  compared to control group.

### Beam walking test

This test was performed on PND44. Between-group differences were observed in time spent to cross the beam ( $p = .005$ ,  $F(3,63) = 4.78$ ) and in the number of missteps ( $p = .0001$ ,  $F(3,63) = 15.74$ ). Results of the beam-walking task are summarized in Figure 4 and indicate that the NS group took a significantly greater amount of time to cross the beam than control (Dunnett's test:  $p = .001$ ,  $F(1,31) = 11.59$ ). ANOVA also indicated that the number of missteps was significantly higher for the NS group compared to control (Dunnett's test:  $p = .0001$ ,  $F(1,31) = 19.02$ ) (Figure 4(B)). No significant differences were observed in terms of time to cross the beam (Dunnett's test:  $p = .79$ ,  $F(1,31) = 0.07$ ) or for the number of missteps (Dunnett's test:  $p = .56$ ,  $F(1,31) = 0.32$ ) for the RS group compared to control. However, MS rats took longer to cross the beam than controls (Dunnett's test:  $p = .021$ ,  $F(1,31) = 6.22$ ), but did not differ from control in relation to the number of missteps (Dunnett's test:  $p = .18$ ,  $F(1,31) = 1.9$ ).

Interestingly, number of missteps in the MS group was significantly lower than in the NS group (Tukey's test:  $p = .001$ ,  $F(1,29) = 14.79$ ),

### Open field test

There were significant difference among groups in all considered parameters (Time spent in corner:  $p = .028$ ,  $F(3,63) = 3.30$ ; Time spent in center:  $p = .0001$ ,  $F(3,63) = 7.93$ ; Number of crossed squares:  $p = .014$ ,  $F(3,63) = 3.85$ ; Rearing time:  $p = .001$ ,  $F(3,63) = 9.78$ ). Figure 5 illustrates the exploratory and locomotor performances of rats during the open field test. Panels A, C and D of Figure 5 reveal greatly decreased exploratory behavior in NS rats. Indeed, compared to the control group, NS rats revealed highly significant differences with (a) increased time spent in corners (Dunnett's test:  $p = .0001$ ,  $F(1,31) = 16.45$ ); (b) decreased time spent in the center (Dunnett's test:  $p = .0001$ ,  $F(1,31) = 19.55$  and (c) decreased rearing time (Dunnett's test:  $p = .001$ ,  $F(1,31) = 21.68$ ). For the RS group, only vertical exploration was significantly diminished compared to control (Dunnett's test:  $p = .004$ ,  $F(1,31) = 9.89$ ), with no significant differences for time spent in corners and/or in the center (Dunnett's test:  $p > .05$ ). Compared to the control group, MS rats exhibited a significant decrease for both time spent in the center (Dunnett's test:  $p = .018$ ,  $F(1,31) = 6.20$ ) and rearing time (Dunnett's test:  $p = .012$ ,  $F(1,31) = 7.10$ ), and an increase in time spent in corners (Dunnett's test:  $p = .037$ ,  $F(1,31) = 4.83$ ).

Panel B of Figure 5 shows that locomotor activity was significantly lower in NS rats compared to the control group (Dunnett's test:  $p = .006$ ,  $F(1,31) = 8.65$ ). There were no significant differences in locomotor activity of RS and MS rats compared with the control group (Dunnett's test: RS vs Control:  $p = .42$ ,  $F(1,31) = 0.67$ ; MS vs Control:  $p = .34$ ,  $F(1,31) = 0.91$ ).

### Elevated plus maze (EPM)

Preliminary ANOVA revealed significant changes in time spent in open arms ( $p = .0001$ ,  $F(3,63) = 14.15$ ), and time of rearing among groups ( $p = .002$ ,  $F(3,63) = 5.76$ ) (Table 2). In EPM tasks, anxiety levels are inversely related to the time spent in open arms (Estanislau & Morato, 2006). Figure 6(A) shows

**Table 1.** Body weight, adrenal gland weight and adrenal gland weight relative to body weight of the control and prenatally stressed groups.

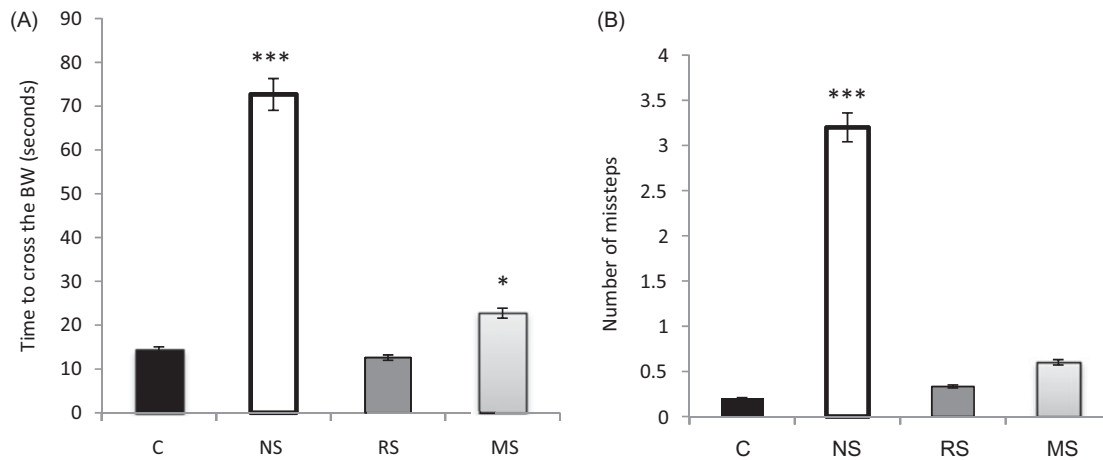
	C	NS	RS	MS
Actual body weight (g)	206.8 $\pm$ 6.85	231.2 $\pm$ 9.47	226.8 $\pm$ 3.06	216.6 $\pm$ 8.63
Actual adrenal weight (mg)	45 $\pm$ 4	76 $\pm$ 4	69 $\pm$ 7	68 $\pm$ 8
Relative adrenal weight (mg/100g)	22 $\pm$ 4	33 $\pm$ 1*	30 $\pm$ 2.7	31 $\pm$ 2.8

Weights are presented as Mean  $\pm$  SEM (Number of rats per group = 16) and were compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. C: control; NS: noise stress; RS: restraint stress; MS: mixed stress. \*Indicates  $p$  value is  $< .05$  compared to control group.

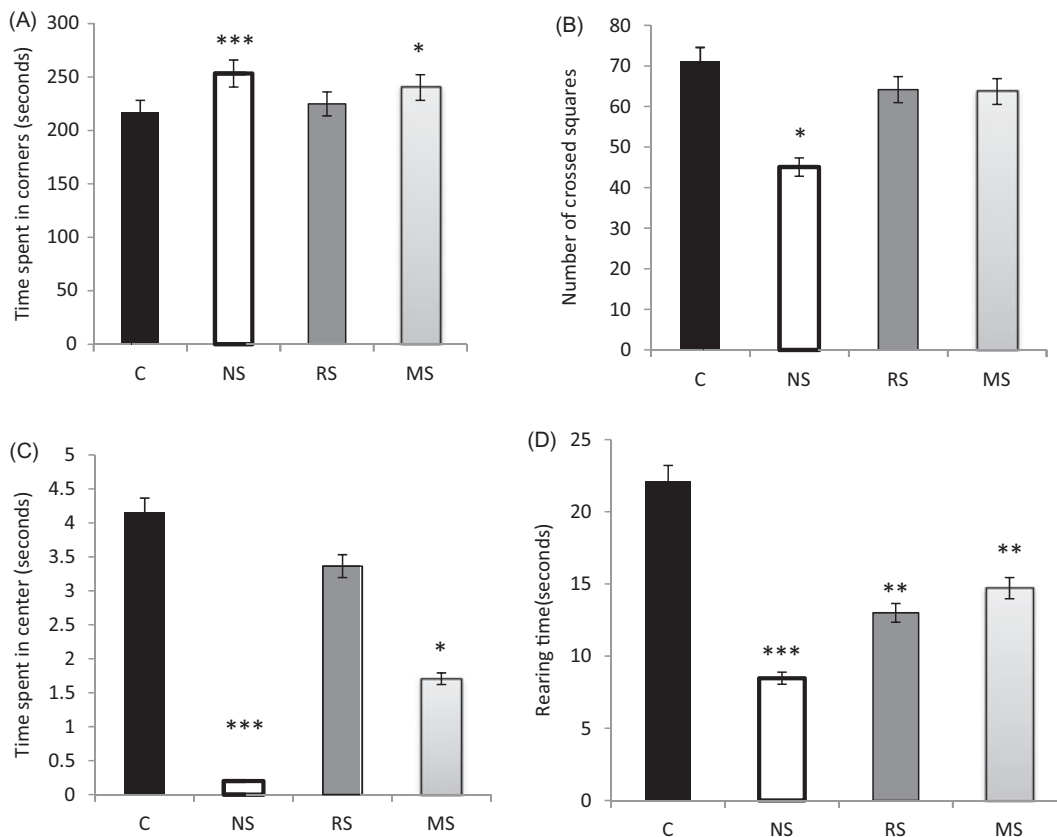
**Table 2.** Proportions of time spent in open and closed arms during the elevated plus maze (EPM) task, expressed as mean (%)  $\pm$  SEM and compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test ( $n = 16$  rats per group).

	C	NS	RS	MS
% of time spent in open arms	39.2 $\pm$ 4.65	28.6 $\pm$ 5.28*	34.6 $\pm$ 5.02	18.3 $\pm$ 4.14***
% of time spent in closed arms	60.5 $\pm$ 4.78	74.6 $\pm$ 5.28	65.3 $\pm$ 5.02	81.2 $\pm$ 5.82

C: control; NS: noise stress; RS: restraint stress; MS: mixed stress. \*Indicates  $p$  value is  $< .05$ , and \*\*\*indicates  $p$  value is  $< .001$  compared to control group.



**Figure 4.** Effect of prenatal stress on time to cross (A) the beam and (B) number of missteps in beam walking test. Values are expressed as Mean  $\pm$  SEM and compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (Number of rats per group = 16). C: control; NS: noise stress; RS: restraint stress; MS: mixed stress. \*Indicates  $p$  value is  $<.05$  vs control. \*\*Indicates  $p$  value is  $<.01$  compared to control group.



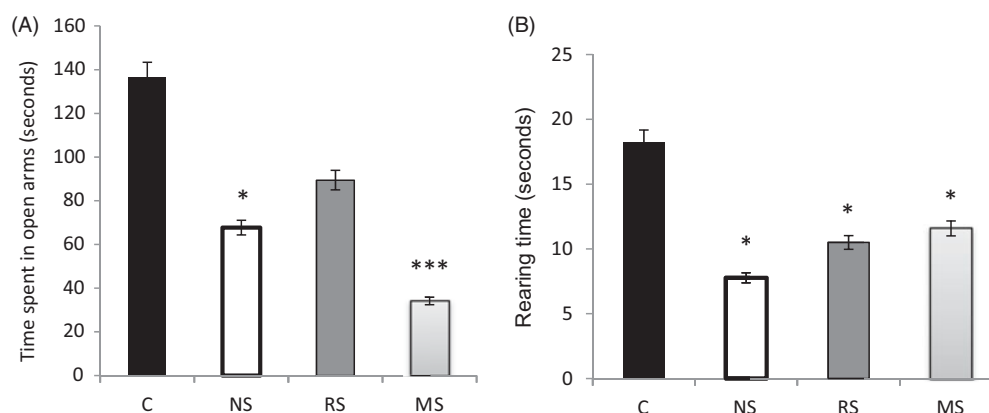
**Figure 5.** (A) Effect of prenatal stress on time spent in the corners, (C) time spent in the center, (B) number of crossed squares and (D) rearing time for the Open Field trials. Values are expressed as Mean  $\pm$  SEM and compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (Number of rats per group = 16). C: control, NS: noise stress, RS: restraint stress, MS: mixed stress. \*Indicates  $p$  value is  $<.05$ . \*\*Indicates  $p$  value is  $<.01$  vs control. \*\*\*Indicates  $p$  value is  $<.001$  vs control group.

that MS rats spent significantly less time in open arms than the control group ( $p = .0001$ ,  $F(1,31) = 16.15$ ), indicating that MS rats expressed high levels of anxiety. Although less pronounced, the NS group also exhibited higher anxiety compared to control (Dunnett's test:  $p = .014$ ,  $F(1,31) = 6.77$ ). However, time spent in open arms was not significantly different between the RS and control groups (Dunnett's test:  $p = .12$ ,  $F(1,31) = 1.97$ ). As shown in Figure 6(B), rearing time was significantly reduced in all stress groups compared to control, suggesting that prenatal noise (Dunnett's test:

$p = .0016$ ,  $F(1,31) = 11.92$ ), restraint (Dunnett's test:  $p = .022$ ,  $F(1,31) = 5.74$ ) and mixed (Dunnett's test:  $p = .045$ ,  $F(1,31) = 4.36$ ) stresses all affected vertical exploration in adolescent rats.

## Discussion

The goal of the present study was to determine the extent to which prenatal noise and restraint stress, applied individually, alter exploratory behavior, locomotor performance and



**Figure 6.** Effect of prenatal stress on (A) time in seconds spent in open arms and (B) time in seconds spent rearing in Elevated Plus Maze trials. Values are expressed as Mean  $\pm$  SEM and compared by one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test (Number of rats per group = 16). C: control; NS: noise stress; RS: restraint stress; MS: mixed stress. \*Indicates  $p$  value is  $<.05$ . \*\*Indicates  $p$  value is  $<.01$  vs control. \*\*\*Indicates  $p$  value is  $<.001$  vs control group.

balance control functioning in juvenile male rats, and how these stressors interact to modify behavior when applied together.

Our results report alterations of locomotor and exploratory behaviors, as well as endocrine disruptions, induced by individually and prenatally applied stress. We found that a combination of noise and restraint stress reduced these effects in rats, but did amplify anxiety levels. Balance control was highly affected by repeated prenatal exposure to noise, which was not the case for restraint alone or combined stress. Previous data have shown that exposure to loud noise might affect not only hearing regions of the brain (Kraus & Canlon, 2012), but also the amygdala and hippocampus that receive direct and indirect neuronal inputs from the central auditory system (Munoz-Lopez et al., 2010; Winer & Lee, 2007).

It is generally assumed that the vestibular system, which plays a key role in posture control, sends signals through the vestibular nerve fibers to the vestibular nuclei (Cullen, 2014) to maintain body posture. Disruption of normal vestibular functioning can result in direct oscillopsia (during walking or standing) or alterations of balanced gait (Curthoys & Halmagyi, 1995; Etienne & Jeffery, 2004). Additionally, it appears that vestibular dysfunction involves a more complex syndrome characterized not only by balance deficits, but also by anxiety disorders (Smith et al., 2010). We found that anxiety level (assessed according to EPM performance) was markedly increased in prenatally noise-stressed and mixed stress rats compared to restraint-stressed and control rats. The vestibular information provided in the ascending pathways to the limbic system and neocortex is required for normal spatial orientation (Chen et al., 2013; Smith & Zheng, 2013) and, in the absence of this information, internal representations become inaccurate and ambiguous, and cognitive performance is affected.

Furthermore, the striatum has been shown to be involved in sensori-motor activity. Pisa and colleagues (Pisa, 1988a, 1988b) reported that localized lesions in the lateral striatum decreased walking speed and balance gait during beam-walking. Based on these and our results, we suggest that disturbed balance may be caused by local alterations to specific brain regions, such as the vestibular system or

striatum or other, by a specific stressor during intrauterine life. Further investigations are needed to determine which brain regions are involved in impaired balance control arising from prenatal noise stress. Previous studies (Jensen Peña et al., 2012) suggest that this impairment might be mediated by maternal glucocorticoids (GC), which can have free access to the entire fetal nervous system if stress exposure downregulates restrictions to the transfer of maternal GC to the fetus.

We also noted that prenatal restraint stress had no effect on balance compared to control. This result supports the idea that the nature of a stressor selectively and differently affects brain regions, with consequent differential effects on behavior and other functions potentially linked to higher reactivity of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (Weinstock, 2008). Interestingly, the combined stress rats took a statistically equivalent amount of time to cross the beam in the BW test as control rats. Thus, perhaps exposure to prenatal noise followed by prenatal restraint reverses the balance impairment observed in rats that only experience prenatal noise stress. To our knowledge, this is the first time that the impact of such a combination of stressors on balance control has been described.

Reduced crossing events in OF trials suggest that locomotor activity was most impaired in noise-stressed rats. Similarly, exploratory behavior (measured as rearing time for vertical exploration and time spent in the center/corners for horizontal exploration) was greatly reduced in the noise-stressed group compared to the restraint-stressed and mixed stress groups. The reduced locomotor and exploratory behavior of stressed rats confirms previous reports showing that stressful environmental factors occurring during perinatal life affect brain plasticity, as well as physiological and neurological functions (Maccari & Morley-Fletcher, 2007), such as down-regulation of the dopaminergic activity that is involved in motivational behaviors (Keck et al., 2013; Powell et al., 2003). Curiously, combined prenatal application of noise and restraint stress did not result in the significant alterations of locomotor and exploratory parameters observed when noise and restraint were applied separately. This result suggests that neurobehavioral responses to multiple stressors do not

necessarily imply additive effects. Evans (1984) suggested that some environmental stressors applied in combination can have a lesser impact on subjects than expected from their individual application. Attenuation of the negative effects (on locomotion and exploration) did not apply when anxiety levels were examined, which were amplified in combined stress rats (revealed by EPM trials). Indeed, our EPM trials revealed that anxiety levels were increased in all prenatally stressed rats compared to controls, notably excepting those subjected to restraint stress. This result is consistent with many previous studies reporting that prenatal stress enhanced the anxiety or depression-like behavior in rats (Maccari & Morley-Fletcher, 2007; Weinstock, 2008)

Though there are many pathways through which maternal stress during pregnancy can shape offspring neurodevelopment, stress-induced elevations in maternal GC levels have emerged as a primary mechanism (Jensen Peña et al., 2012), supported by studies in rats in which the effects of prenatal stress are attenuated in adrenalectomized females (Barbazanges et al., 1996). In our study, the low anxiety in the restraint stress group might be explained if 10 min of maternal restraint per day was insufficient to induce an effect.

However, we found mixed stress rats to be highly anxious compared to both the noise and restraint stress groups. It seems that a combination of prenatal noise and restraint stress induced additive effects, but only for anxiety levels. Taken together, we can deduce that prenatal exposure to combined noise and restraint stress simultaneously had a reduced impact (non-additive effect) on locomotor and exploratory activities compared to individually applied stresses, but had an enhanced impact (additive effect) on anxiety levels. Thus, our findings suggest that stressors (monotypic or multiple) induce differential effects when they are applied together or separately, abrogating some behavioral disruptions or enhancing others. We propose further studies to clarify how multiple stressors can combine to attenuate or potentiate their effects.

ACTH concentrations and relative adrenal weight data support our findings. ACTH concentrations were not significantly higher in rats that underwent mixed prenatal stress, but noise-stressed rats exhibited significantly increased ACTH concentrations. Similarly, hypertrophy of adrenal glands was only registered for the noise-stressed group, suggesting that repeated loud noise, even applied just for 3 min/day, elicits the strongest effect as hyperactivity in the HPA axis. The mechanisms involved in interactions between stressors are still unknown. To elucidate the relationships between prenatal stress and the different effects observed here, further study of maternal behavior under the same experimental conditions will be necessary. Such studies should examine maternal GC levels and the impact of giving anxiolytic drugs to pregnant rats to determine if diminished anxiety can influence the subsequent behavioral alterations in offspring.

## Conclusions

In summary, results presented here provide additional evidences on deleterious effects of prenatal exposure to stress on locomotion and exploratory behavior as well as the

enhancement of anxiety like behavior. The main findings of this work are (a) The impact of the nature of stressor in yielding different biological and neurobehavioral effects. Here, prenatal noise stress was the stressor that generated the stronger alterations of locomotion, exploration and reactivity of the HPA axis (high plasma concentration of ACTH and adrenal hypertrophy); (b) the exposure to combined stressors can generate at the same time, additive and non-additive effects comparable to those observed with separate application. Locomotion, horizontal exploration and balance impairments were attenuated, and anxiety level was enhanced by mixed stress; (c) finally, locomotor activity was highly affected only by noise and not restraint stress suggesting that the two stressors interact differently with brains regions related to balance control. However, the mechanisms involved in this alteration remain unknown and data obtained by a behavior assessment battery have a limited relevance for understanding the origin of neurobiological abnormalities observed, and further research is needed to clarify how multiple stressors interact to induce at the same time an increase of some alterations and decrease of some others.


## Acknowledgements


We thank Asma Lekouaghet for her valuable help in blood sampling. We are also grateful to John O'Brien, Deepanwita Bose and Masmoudi Moatassim Bilah for correction of the use of English in the manuscript.


## Disclosure statement


The authors of this paper declare no conflict of interest.


## ORCID


Soumeya Badache  <http://orcid.org/0000-0002-0361-5735>

Slim Bouslama  <http://orcid.org/0000-0002-4765-1463>

Oualid Brahmia  <http://orcid.org/0000-0002-7457-6569>

Abdel Madjid Bâiri  <http://orcid.org/0000-0003-1935-5648>

Abdel Krim Tahraoui  <http://orcid.org/0000-0001-7114-9556>

Ali Ladjama  <http://orcid.org/0000-0002-7540-3666>

## References

- Appart A, Lange A-K, Sievert I, Bihain F, Tordeurs D. (2016). Le trouble de l'adaptation et le DSM-5: une revue de la. Available at: [litterature./data/revues/00137006/unassign/S001370061630063X/](http://litterature./data/revues/00137006/unassign/S001370061630063X/).
- Babri S, Doosti M-H, Salari A-A. (2014). Strain-dependent effects of prenatal maternal immune activation on anxiety- and depression-like behaviors in offspring. *Brain Behav Immun* 37:164–76.
- Barbazanges A, Piazza PV, Moal ML, Maccari S. (1996). Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci* 16:3943–9.
- Basner M, Babisch W, Davis A, Brink M, Clark C, Janssen S, Stansfeld S. (2014). Auditory and non-auditory effects of noise on health. *Lancet* 383:1325–32.
- Benoit JD, Rakic P, Frick KM. (2015). Prenatal stress induces spatial memory deficits and epigenetic changes in the hippocampus indicative of heterochromatin formation and reduced gene expression. *Behav Brain Res* 281:1–8.
- Cabrera RJ, Rodríguez-Echandía EL, Jatuff ASG, Fóscolo M. (1999). Effects of prenatal exposure to a mild chronic variable stress on body weight,

- preweaning mortality and rat behavior. *Braz J Med Biol Res* 32:1229–37.
- Cao-Lei L, Dancause KN, Elgbeili G, Massart R, Szyf M, Liu A, Laplante DP, King S. (2015). DNA methylation mediates the impact of exposure to prenatal maternal stress on BMI and central adiposity in children at age 13½ years: Project Ice Storm. *Epigenetics* 10:749–61.
- Caspi A, Hariri AR, Holmes A, Uher R, Moffitt TE. (2010). Genetic sensitivity to the environment: the case of the serotonin transporter gene and its implications for studying complex diseases and traits. *Am J Psychiatry* 167:509–27.
- Chen A, Deangelis GC, Angelaki DE. (2013). Functional specializations of the ventral intraparietal area for multisensory heading discrimination. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33:3567–81.
- Cullen KE. (2014). The neural encoding of self-generated and externally applied movement: implications for the perception of self-motion and spatial memory. *Front Integr Neurosci* 7:108.
- Curthoys IS, Halmagyi GM. (1995). Vestibular compensation: a review of the oculomotor, neural, and clinical consequences of unilateral vestibular loss. *J Vestib Res Equilib Orientat* 5:67–107.
- Diaz R, Brown RW, Seckl JR. (1998). Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions. *J Neurosci* 18:2570–80.
- Diehl K-H, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J-M, et al. (2001). A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol* 21:15–23.
- Estanislau C, Morato S. (2006). Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *Int J Dev Neurosci* 24:255–62.
- Etienne AS, Jeffery KJ. (2004). Path integration in mammals. *Hippocampus* 14:180–92.
- Evans GW. (1984). *Environmental Stress* (CUP Archive).
- Hall CS. (1934). Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18:385–403.
- Häusler R. (2004). The effects of acoustic overstimulation. *Ther Umsch Rev Ther* 61:21–9.
- Jensen Peña C, Monk C, Champagne FA. (2012). Epigenetic effects of prenatal stress on 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 in the placenta and fetal brain. *PLoS ONE* 7:e39791
- Keck TM, Suchland KL, Jimenez CC, Grandy DK. (2013). Dopamine D4 receptor deficiency in mice alters behavioral responses to anxiogenic stimuli and the psychostimulant methylphenidate. *Pharmacol Biochem Behav* 103:831–41.
- Kraus KS, Canlon B. (2012). Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear Res* 288:34–46.
- Maccari S, Morley-Fletcher S. (2007). Effects of prenatal restraint stress on the hypothalamus–pituitary–adrenal axis and related behavioural and neurobiological alterations. *Psychoneuroendocrinology* 32(Suppl 1): S10–S5.
- Meek LR, Burda KM, Paster E. (2000). Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol Behav* 71:543–9.
- Munoz-Lopez MM, Mohedano-Moriano A, Insausti R. (2010). Anatomical pathways for auditory memory in primates. *Front Neuroanat* 4:129–142.
- Nazeri M, Shabani M, Ghotbi Ravandi S, Aghaei I, Nozari M, Mazhari S. (2015). Psychological or physical prenatal stress differentially affects cognition behaviors. *Physiol Behav* 142:155–60.
- Pankakoski E, Tähkä KM. (1982). Relation of adrenal weight to sex, maturity and season in five species of small mammals. *Ann Zool Fenn* 19:225–32.
- Pellow S, File SE. (1986). Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 24:525–9.
- Pisa M. (1988a). Motor somatotopy in the striatum of rat: manipulation, biting and gait. *Behav Brain Res* 27:21–35.
- Pisa M. (1988b). Motor functions of the striatum in the rat: critical role of the lateral region in tongue and forelimb reaching. *Neuroscience* 24:453–63.
- Powell SB, Paulus MP, Hartman DS, Godel T, Geyer MA. (2003). RO-10-5824 is a selective dopamine D4 receptor agonist that increases novel object exploration in C57 mice. *Neuropharmacology* 44:473–81.
- Schneider ML, Coe CL. (1993). Repeated social stress during pregnancy impairs neuromotor development of the primate infant. *J Dev Behav Pediatr* 14:81–87.
- Smith PF, Zheng Y. (2013). From ear to uncertainty: vestibular contributions to cognitive function. *Front Integr Neurosci* 7:84–97.
- Smith PF, Darlington CL, Zheng Y. (2010). Move it or lose it-is stimulation of the vestibular system necessary for normal spatial memory? *Hippocampus* 20:36–43.
- van Os J, Selten JP. (1998). Prenatal exposure to maternal stress and subsequent schizophrenia. The May 1940 invasion of The Netherlands. *Br J Psychiatry* 172:324–6.
- Weinstock M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev* 32:1073–86.
- Winer JA, Lee CC. (2007). The distributed auditory cortex. *Hear Res* 229:3–13.
- Yehuda R, Engel SM, Brand SR, Seckl J, Marcus SM, Berkowitz GS. (2005). Transgenerational effects of posttraumatic stress disorder in babies of mothers exposed to the world trade center attacks during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 90:4115–18.
- Zeng Y, Brydges NM, Wood ER, Drake AJ, Hall J. (2015). Prenatal glucocorticoid exposure in rats: programming effects on stress reactivity and cognition in adult offspring. *Stress* 18:353–61.
- Zheng Y, Fan W, Zhang X, Dong E. (2016). Gestational stress induces depressive-like and anxiety-like phenotypes through epigenetic regulation of BDNF expression in offspring hippocampus. *Epigenetics* 11:150–62.