

## La gestation chez le rat wistar a-t-elle un effet modérateur sur la neurotoxicité du toluène ?

Asma Latreche, Hacène Frih, Bachir Ali Rachedi, Redha Djenidi, Kamilia Guedri, Hakima Taya, Leila Sahraoui & Abdelkrim Tahraoui

Laboratoire de Neuroendocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Faculté des sciences, Université Badji Mokhtar Annaba, BP 12 23000, Annaba, Algérie.

Révisé le 17/12/2011

Accepté le 07/05/2012

### ملخص

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

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

### Résumé

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

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

### Abstract

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

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

Auteur correspondant : frihhacene@yahoo.fr

## 1. INTRODUCTION

Chez la femme, la dépression et l'anxiété augmentent durant la période périnatale [1] et après l'accouchement. A ce titre, il a été rapporté que ces changements comportementaux sont probablement tributaires des variations des niveaux de progestérone plasmatique [2-5]. Chez les rats femelles, la gestation engendre des changements comportementaux en réponse aux différents stimuli de l'environnement [6]. Galea *et al.* [7] ont constaté une augmentation des performances mémoratives au test du labyrinthe de Morris. Une réduction de l'anxiété a été également signalée au labyrinthe en croix surélevé [8]. Au test de la nage forcée, la progestérone semble avoir un effet antidépresseur-like [9, 10, 15]. Ces résultats suggèrent que la gestation peut procurer, ou encore semble procurer à l'organisme une barrière protectrice en réponse aux changements perpétuelles de l'environnement. Cette protection se ferait, *a priori, via* la production de stéroïdes dits neuroactifs (progestérone et ses métabolites, etc.) et des facteurs de croissance élaborés au cours de la gestation. Il a été démontré que ces produits sont fortement impliqués dans l'installation de l'anxiété [11] et de la dépression [12, 13].

La nage forcée, test de l'efficacité des antidépresseurs, représente une situation stressante aversive dont le rat ne peut échapper, et produit l'immobilité, ou le désespoir comportemental [14-18]. Les rats montrent également des comportements actifs, comme la nage et l'escalade. Les molécules qui diminuent la durée d'immobilité dans la nage forcée sont considérées comme étant des antidépresseurs efficaces [19]. Au cours du test de la nage forcée ou *Forced Swimming Test* (FST), les antidépresseurs, produisant une élévation noradrénergique ou dopaminergique prédominante, réduisent l'immobilité par l'augmentation du temps d'escalade [20, 21]. En revanche, ceux qui activent plutôt la 5-hydroxytryptamine (5HT), réduisent l'immobilité par l'augmentation de la nage [22]. Les investigations faites sur les effets antidépresseurs-like de la progestérone [5, 23] ou de la gestation [11], ont donné des résultats contradictoires où il a été constaté que la progestérone [24] et ses métabolites neurostéroïdes (3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one ou allopregnénolone) entraînent un effet antidépresseur-like au cours de la nage forcée [18, 25]. Dans ce contexte, et considérant l'implication de ces produits dans les

changements comportementaux qui surviennent au cours de la gestation, nous avons opté pour une démarche expérimentale basée sur l'administration, à des rattes gestantes Wistar, d'une dose élevée ou encore sublétales (1/4 de la DL 50) d'un produit neurotoxique, le toluène, qui a pour voie privilégiée les neurones GABAergiques (GABA est le seul neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central). Pour tester la modification de la voie GABAergique suite à l'administration du toluène et le rôle probable joué par la grossesse dans la protection de cette voie, nous avons utilisé, sept jours après la mise bas, le test de la nage forcée (FST), modèle animal de la dépression, que nous avons utilisé avec un agoniste de type antidépresseur GABAergique, le Clonazépam. Cette procédure nous permettra de confirmer si les produits de la grossesse (NAS: la progestérone) peuvent protéger les voies GABAergiques.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 Matériel biologique

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

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

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

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

dans le frottis vaginal qui correspond alors au premier jour de la gestation.

## 2.2 Détermination de la réceptivité sexuelle

Quotidiennement (de 10h00 à 11h00), après avoir fait l'objet d'un masquage vaginal, les femelles ont été mises brièvement avec un mâle.

La réceptivité sexuelle a été déterminée par la réponse des femelles expérimentales à la demande du mâle.

Les rattes qui se sont montrées réceptives par leur comportement, ont été considérées comme étant en œstrus, les autres ont été retirées.

Le cycle œstral a été déterminé par la cytologie vaginale. Après avoir identifié les phases du cycle œstral, les rattes ont servi à former les 4 lots expérimentaux (n = 16) :

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

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

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

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

## 2.3 Administration du toluène

L'administration du toluène a été réalisée par voie IP à la dose de 332 mg/ kg de poids corporel correspondant au ¼ de la DL50 établie par IUCLID [26].

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

Les lots témoins et gestantes non traitées recevaient selon le même protocole, une injection de 2 ml d'huile d'olive.

## 2.4 Tests comportementaux : Test de la nage forcée

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

Chez le rat, certains changements de comportement qui se produisent peuvent être

analysés au cours du test de la nage forcée (FST), qui est conçu pour tester le profil antidépresseur des médicaments. La présente étude vise à analyser, chez les rattes gestantes après la mise bas, l'efficacité d'un agoniste GABAergique, le Clonazépam ; ces changements de comportement sont affichés dans la FST [19, 15]. Cette approche peut nous confirmer si la voie GABAergique est altérée chez les quatre lots expérimentaux.

Les rattes ont été placées dans un aquarium dont l'eau est maintenue à 21-22 °C, d'une profondeur de 35 cm, pour un pré-test de 15 min. Des injections (solution saline ou Clonazépam) sont faites à 1 heure, 19 heures et 23 heures avant le test de 5 min. La profondeur de l'eau de 35 cm pousse les rats à nager ou à flotter.

Le Clonazépam est administré par voie sous cutanée dans un volume équivalent à 2 ml / kg à une dose de 0.25 mg / ml [19, 27]. La solution saline (0.9%) a également été administrée par voie sous cutanée dans un volume équivalent à 2 ml / kg.

La séance quotidienne de nage a été filmée pour l'analyse comportementale. Les temps d'immobilité, de nage et d'escalade sont calculés.

## 2.5 Prélèvements

### 2.5.1 Prélèvements sanguins

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

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

### 2.5.2 Dissection et prélèvement des organes

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

## 2.6 Analyse statistique des résultats

Les résultats sont présentés sous forme de moyennes  $\pm$  SEM. Un test ANOVA à deux critères de classification pour la comparaison multiples des moyennes a été utilisé, suivi d'un test de Newman et Keuls, en cas de différence significative entre les différents lots.

Les résultats des tests de liaison ont été analysés par le test t de Student. Ils sont considérés comme étant significatifs à  $p < 0.05$ .

## 3. RESULTATS

### 3.1 Caractérisation des paramètres de la gestation

Les paramètres de la gestion sont estimés par

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

Pour ce qui est du gain du poids, on constate qu'il est plus important chez les femelles gestantes non traitées au toluène (TG :  $29.1 \pm 7.7$  vs Tol :  $24.5 \pm 6.5$ ). Le nombre moyen de petits par portée est plus élevé chez les témoins que chez les femelles gestantes traitées au toluène (TG :  $10.5 \pm 0.5$  vs TolG :  $6.66 \pm 1.05$ ). La même constatation est relevée pour le poids moyen des petits (TG :  $7.0 \pm 0.12$  vs TolG :  $5.8 \pm 0.09$ ). Le pourcentage des petits mâles est relativement faible chez les rattes traitées au toluène (TG :  $42.8 \pm 2.2$  vs TolG :  $36.2 \pm 1.3$ ).

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

Lot/ Paramètres	TG	TOLG
<b>Durée de gestation (j)</b>	$22.1 \pm 0.5$	$23.4 \pm 0.3^*$
<b>Gain de poids (%)</b>	$29.1 \pm 7.7$	$24.5 \pm 6.5^*$
<b>Gain de poids (g)</b>	$42.0 \pm 0.9$	$38.0 \pm 1.5^*$
<b>Mortalité néonatale (Totale)</b>	1.0 %	3.5% **
<b>Nombre moyen de petits par portée</b>	$10.5 \pm 0.5$	$6.7 \pm 1.05^*$
<b>Poids moyen des petits (g)</b>	$7.0 \pm 0.12$	$5.8 \pm 0.09^*$
<b>% des rats mâles</b>	$42.8 \pm 2.2$	$36.2 \pm 1.3^{**}$

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

### 3.2 Variation des paramètres hormonaux

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

L'appréciation du niveau de la LH a été effectuée au cours du 7<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jour de la gestation et 2 jours après la mise bas (ApMB) (Fig. 1). Au 7<sup>ème</sup> jour du prélèvement (qui correspond au 7<sup>ème</sup> jour de la gestation pour les femelles gestantes et au 3<sup>ème</sup> jour du traitement au toluène pour tous les animaux), le traitement au toluène seul (sans gestation), a provoqué une augmentation très hautement significative des taux de LH plasmatique par rapport aux animaux témoins (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $1.838 \pm 0.094$  vs Basale, 7<sup>ème</sup> :  $1.18 \pm 0.095$ ). Ce taux s'effondre au 14<sup>ème</sup> jour (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $1.838 \pm 0.094$  vs Tol, 14<sup>ème</sup> :  $0.55 \pm 0.02$ ), avant de redevenir normal 10 jours après l'arrêt du traitement (Basale, ApMB :  $1.020 \pm 0.047$  vs Tol, ApMB :  $0.944 \pm$

0.22). La gestation seule a provoqué une augmentation significative du taux de LH au 14<sup>ème</sup> jour (TG, 14<sup>ème</sup> :  $1.34 \pm 0.17$  vs Basale, 14<sup>ème</sup> :  $1.07 \pm 0.063$ ).

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

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

Les variations de la progestéronémie (Fig. 2) semblent être plus sensibles, aussi bien à la gestation, qu'au traitement au toluène.

Au 7<sup>ème</sup> jour du prélèvement, le traitement au toluène (chez les deux groupes : gestant et non gestant) a provoqué une augmentation très hautement significative des taux de progestérone plasmatique par rapport aux animaux témoins (Tol, 7<sup>ème</sup> :  $2.757 \pm 0.660$  ;

TolG, 7<sup>ème</sup> :  $2.632 \pm 0.620$  vs Basale, 7<sup>ème</sup> :  $1.39 \pm 0.17$ ). Ce taux s'effondre progressivement, même après l'arrêt du traitement, pour atteindre une valeur très basse (Tol, ApMB :  $0.684 \pm 0.094$  vs Basale, ApMB :  $1.201 \pm 0.062$ ).

Associé à la gestation, au 14<sup>ème</sup> jour, le traitement au toluène a provoqué une fluctuation inverse des taux de progestérone

plasmatique par rapport à la gestation seule (TG, 14<sup>ème</sup> :  $0.216 \pm 0.070$ ; TolG, 14<sup>ème</sup> :  $3.444 \pm 0.330$  vs Basale, 14<sup>ème</sup> :  $1.470 \pm 0.094$ ).

L'arrêt du traitement a engendré un rétablissement des taux de progestérone plasmatique chez les rattes gestantes (TG, ApMB :  $2.571 \pm 0.180$ ; TolG, ApMB :  $2.49 \pm 0.27$  vs Basale, ApMB :  $1.201 \pm 0.062$ ).

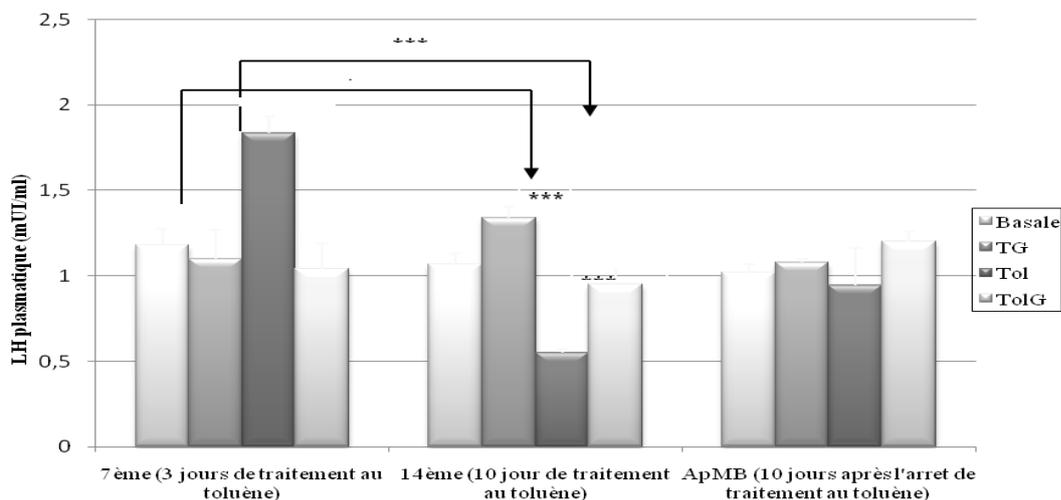


Figure 1. Variation du taux de la LH plasmatique (mUI/ml) suite au traitement au toluène du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7<sup>ème</sup> jour, 14<sup>ème</sup> jour et après mise bas (ApMB) ( $m \pm s$ ;  $n=16$ ). (\*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

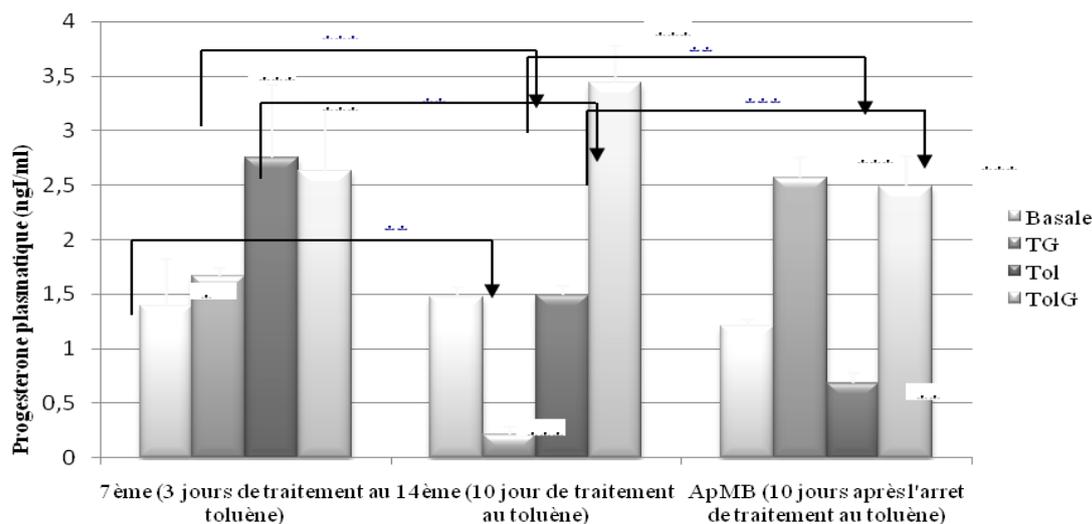


Figure 2. Variation du taux de la progestérone plasmatique (ng/ml) suite au traitement au toluène du 4<sup>ème</sup> au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez les rattes Wistar gestante au 7<sup>ème</sup> jour, 14<sup>ème</sup> jour et après mise bas (ApMB) ( $m \pm s$ ;  $n=16$ ) (\*  $p < 0.05$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

### 3.3 Variation des paramètres de la nage forcée

Le tableau 2 montre une efficacité du traitement au Clonazepam chez les rattes témoins non gestantes, d'où réduction importante du temps d'immobilité (Basale sans Clonazepam :  $249.56 \pm 32.14$  vs Basale + Clonazepam  $127.74 \pm 52.67$ ).

Le Clonazepam s'avère efficace également

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

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

Comportement	Temps de nage (sec)	Temps d'immobilité (sec)	Temps d'escalade (sec)
Basale sans Clonazepam	$32.45 \pm 12.69$	$249.56 \pm 32.14$	$47.86 \pm 12.57$
Basale + Clonazepam	$98.08 \pm 29.73$ ***	$127.74 \pm 52.67$ **	$74.17 \pm 22.94$ ***
TG + Clonazepam	$127.20 \pm 0.63$ ***	$119.24 \pm 2.32$ ***	$53.56 \pm 2.52$
Tol + Clonazepam	$42.18 \pm 11.67$	$257.46 \pm 21.57$	$20.35 \pm 26.92$
TolG + Clonazepam	$77.14 \pm 29.09$ *	$155.06 \pm 30.77$ ***	$67.82 \pm 15.88$

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

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

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

Les résultats concernant le poids du cerveau (Tab. 3) montrent que le traitement au toluène entraîne une réduction du poids du cerveau chez les rattes non gestantes traitées au toluène (Basale :  $0.826 \pm 0.0452$  vs Tol :  $0.67 \pm 0.013$ ).

Cette diminution est moins importante chez les femelles gestantes traitées au toluène (Basale :  $0.826 \pm 0.0452$  vs TolG :  $0.75 \pm 0.107$ ).

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

Tableau 3. Variation du poids relatif (g/100g de rat) des ovaires, cerveau et surrénales chez les rattes gestantes et non gestantes traitées au toluène (m ± s ; n=16).

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

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

#### 4. DISCUSSION

Dans notre étude, l'application d'un stress subchronique au toluène (pendant 10 jours), a provoqué des perturbations endocriniennes (LH et progestérone plasmatiques) et pondérales (cerveau, ovaires et surrénales) qui semblent être irréversibles chez les animaux non gravides traités au toluène seul. Par contre, le même traitement associé à la gestation laisse apparaître un effet réparateur dix jours après l'arrêt du traitement. Pour ce qui est des variations pondérales, nous avons relevé une diminution du poids du cerveau et une augmentation du poids des ovaires et des surrénales chez les animaux traités au toluène seul. Ce résultat n'a pas été obtenu chez les rattes gestantes traitées au toluène où nous avons enregistré une reprise relative du poids du cerveau et des ovaires. En outre, le poids relatif des surrénales, n'a pas été affecté chez le lot TolG. Il semblerait que, dans le contexte de la gestation, les réponses adaptatives de l'animal liées à l'administration du toluène soient différentes de celles obtenues chez les animaux gravides. Un autre résultat qui mérite d'être signalé et qui est en faveur de notre hypothèse, est la variation des paramètres hormonaux (LH et progestérone plasmatiques) où un effondrement des taux de progestérone est noté au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation chez le lot TG. A la mise bas, nous avons constaté un rétablissement des niveaux de progestérone. Des tendances inverses dans les variations des taux de LH plasmatique ont été obtenues, après la mise bas, avec une augmentation des taux au 14<sup>ème</sup> jour de la gestation, puis un retour à la normale. Ceci dénote d'un bon état de fonctionnement de la boucle du rétrocontrôle de l'axe gonadotrope. Le traitement au toluène seul (Tol) a provoqué une augmentation des taux de progestérone plasmatique par rapport aux animaux témoins. Ce taux s'effondre progressivement, même après l'arrêt du traitement.

Les taux de LH ne semblent pas être aussi affectés et nous avons enregistré un rétablissement des taux 10 jours après l'arrêt du traitement. Une dissociation entre la stimulation hypothalamique et la réponse gonadotrope périphérique a été observée (LH normale, progestérone diminuée), supposant une altération possible des récepteurs centraux aux stéroïdes. Associé à la gestation, au 14<sup>ème</sup> jour, le traitement au toluène a provoqué des fluctuations inverses des taux de progestérone plasmatique par rapport à celles trouvées chez les rattes gestantes non traitées. L'arrêt du traitement au toluène a engendré un rétablissement des taux de progestérone plasmatique chez le groupe d'animaux gestants. Enfin, le point fort de nos résultats est celui de la nage forcée où nous avons testé l'efficacité d'un agoniste GABAergique, le Clonazepam. A ce niveau, le Clonazepam s'est avéré inefficace chez le lot Tol. Par contre, l'administration de cet antidépresseur aux rattes gestantes traitées au toluène réduit considérablement le temps d'immobilité, d'où son efficacité.

La question qui se pose est : Quels sont les mécanismes qui conduisent à cet effet modérateur de la gestation sur la nocivité du toluène ? Les éléments de réponse à cette question se résument dans les points suivants : Instabilité du comportement de l'animal au cours des différentes phases de la gestation, cette question ayant été soulevée depuis des années aussi bien chez l'homme que chez l'animal [28-31].

Ce comportement suscit est probablement tributaire de fluctuations hormonales [32, 33] et neurochimiques [34], et il a été observé une expression intracellulaire de la progestérone dans les différentes régions du cerveau [35, 36] ainsi que la découverte de l'action non génomique de la progestérone au niveau central [37, 38]. La progestérone joue un rôle très important dans la modulation neurochimique du GABAa [34, 39, 40] et favorise la plasticité neuronale [41].

Aussi, la réduction des concentrations basales du GABA au cours de la gestation semble avoir un rôle protecteur des neurones GABAergique. Toutes ces données sont en faveur de l'implication de la progestérone et ses métabolites, en qualité d'hormones neuroactives, qui agissent en empruntant des régions localisées du cerveau, particulièrement le système GABAergique. En effet, les hormones stéroïdes influencent la survie des neurones, la croissance des neurites et la formation des raccords synaptiques pendant la vie embryonnaire et postnatale, puis continuent ensuite à induire la plasticité du système nerveux adulte [42-44]. En particulier, après des dommages neuronaux ou pendant les maladies anxieuses, les stéroïdes peuvent exercer des actions protectrices sur des neurones et des cellules gliales et favoriser des processus régénératoires [45]. Cependant, dans des circonstances particulières, quelques stéroïdes peuvent également entraîner des dommages du tissu nerveux. Les stéroïdes exercent leurs effets sur le système nerveux en réglant l'expression des gènes hormone-sensibles spécifiques ou en modulant l'activité des récepteurs de neurotransmetteurs, en particulier le type A -acide aminobutyrique (GABAa), la D-aspartate n-méthylque (NMDA). Ainsi, la progestérone favorise la formation de nouvelles gaines de myéline après la lésion du nerf sciatique du rongeur en activant la transcription des gènes codant pour les protéines importantes de la myéline [46]. Le sulfate de prégnénolone et la 3,5-tétrahydroprogestérone exercent leurs effets psycho-pharmacologiques en modulant des récepteurs de GABAa. Ils ont été abordés dans l'anxiété, dans la dépression et la mémoire [47]. Des stéroïdes qui modulent l'activité des récepteurs de neurotransmetteurs et qui changent l'excitabilité des cellules nerveuses ont été qualifiés en tant que neuroactifs [48]. Des stéroïdes agissant sur des neurones et des cellules gliales sont produits par les glandes endocrines stéroïdogènes telles que les gonades et les surrénales, et ils atteignent le cerveau et les nerfs périphériques par voie sanguine. De par, leur nature lipophile, ils traversent facilement les barrières hémato-encéphaliques et s'accumulent rapidement dans les tissus nerveux après administration systémique, excepté les stéroïdes conjugués tels que des esters de sulfate.

En outre, quelques stéroïdes peuvent être formés localement dans le cerveau et dans des nerfs périphériques, par le métabolisme des hormones de circulation ou par la synthèse *de*

*novo* du cholestérol. Ces derniers ont été appelés des neurostéroïdes. Cette limite ne désigne pas une classe particulière de stéroïdes, mais se rapporte seulement à leur site de synthèse : le système nerveux [49-51]. Par exemple, la progestérone qui est présente dans le cerveau provient des ovaires et des surrénales et de la synthèse locale par des neurones et des cellules gliales. Un rôle physiologique pour la synthèse locale des neurostéroïdes dans le système nerveux a seulement été documenté dans quelques cas.

## 5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

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

## REFERENCES

- [1] Savage J., Giarratano G., Bustamante-Forest R., Pollock C., Robichaux A., Pître S., 2010. Post-Katrina perinatal mood and the use of alternative therapies. *J. Holist. Nurs.*, Vol. 28(2), 123-32.
- [2] Miguel M.H., Patricia T.A.N. 2001. Antidepressant-like actions of pregnancy, and progesterone in Wistar rats forced to swim. *Psychoneuroendocrinol.*, Vol. 26, 479-491.

- [3] Fink G., Summer B.W., McQueen J.K., Wilson H., Rosie R., 1998. Sex steroid control of mood, mental state and memory. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. Vol. 25(10), 764-75.
- [4] Schmidt P.J., Rubinow D.R., 1997. Neuroregulatory role of gonadal steroids in humans. *Psychopharmacology Bulletin*, Vol. 33, 219-220.
- [5] Andrade S., Silveira S.L., Arbo B.D., Batista B.A., Gomez R., Barros H.M., Ribeiro M.F. 2010. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.*, Vol. 99(5), 687-90.
- [6] Fleming A.S., Luebke C. 1981. Timidity prevents the virgin female rat from being a good mother: emotionality differences between nulliparous and parturient females. *Physiol. Behav.*, Vol. 27, 863-870.
- [7] Galea L.A.M., Ormerod B.K., Sampath S., Kostaras X., Wilkie D.M., 2000. Phelps M.T. Spatial working memory and hippocampal size across pregnancy in rats. *Hormones Behav.*, Vol. 37, 86-95.
- [8] Fernández-Guasti A., Picazo O., 1999. Sexual differentiation modifies the allopregnanolone anxiolytic actions in rats. *Psychoneuroendocrinol.*, Vol. 24(3), 251-67.
- [9] Bernardi M., Vergoni A.V., Sandrini M., Tagliavini S., Bertolini A., 1989. Influence of ovariectomy, estradiol and progesterone on the behavior of mice in an experimental model of depression. *Physiol. Behav.*, Vol. 45, 1067-1068.
- [10] Molina M., Contreras M., Tellez-Alcántara P., 2000. Antidepressant-like effects of pregnancy and progesterone in Wistar rats as measured in the differential reinforcement of the low-rate 72s task. *Psychopharmacol.*, Vol. 151, 306-311.
- [11] Neumann I.D., Wigger A., Liebsch G., Holsboer F., Landgraf R., 1998. Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuro-endocrinology*, Vol. 23, 449-463.
- [12] Seeman M.V., Lang M., 1990. The role of estrogens in schizophrenia gender differences. *Schizophrenia Bulletin*, Vol. 16, 185-194.
- [13] Shi C.G., Wang L.M., Wu Y., Wang P., Gan Z.J., Lin K., Jiang L.X., Xu Z.Q., Fan M., 2010. Intranasal Administration of Nerve Growth Factor Produces Antidepressant-Like Effects in Animals. *Neurochem Res.*, Vol. 35(9), 1302-14.
- [14] Kirby L.G., Lucki I., 1997. Interaction between the forced swimming test and fluoxetine treatment on extracellular 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in the rat. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, Vol. 282, 967-976.
- [15] Porsolt R.D., LePichon M., Jalfre M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, Vol. 266, 730-732.
- [16] Wieland S., Lucki I., 1990. Antidepressant-like activity of 5HT-1A agonists measured with the forced swim test. *Psychopharmacology (Berl)*, Vol. 101(4), 497-504.
- [17] Briceño F., Arcaya J.L., Carrizo E., Rincón J., Mosquera J., 2010. Forced Swimming Test Decreases Chemotactic Responsiveness and Expression of CD11a in Rat Monocytes. *Neuroimmunomodulation*, Vol. 17(6), 369-78.
- [18] Molina-Hernández M., Téllez-Alcántara N.P., Olivera-Lopez J.I., Jaramillo M.T., 2009. Olanzapine plus 17-beta estradiol produce antidepressant-like actions in rats forced to swim. *Pharmacol Biochem Behav.*, Vol. 93(4), 491-7.
- [19] Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M., 1978. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 15; 47(4), 379-91.
- [20] Lopez C., Lucki I., 2000. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat forced swimming test. *Neuropsychopharmacol.*, Vol. 22, 191-199.
- [21] Kawaura K., Honda S., Soeda F., Shirasaki T., Takahama K. A., 2010. Novel antidepressant-like action of drugs possessing GIRK channel blocking action in rats. *Yakugaku Zasshi*, Vol. 130(5), 699-705.
- [22] Detke M.J., Rickels M., Lucki I., 1995. Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacol.*, Vol. 121, 66-72.
- [23] Reddy D.S., Kaur G., Kulkarni S.K., 1998. Sigma ( $\delta$ 1) receptor mediated antidepressant-like effects of neurosteroids in the Porsolt forced swim test. *NeuroReport*, Vol. 9, 3069-3073.
- [24] Martinez L., Contreras C.M., Saavedra M., 1999. Progesterone reduces immobility in rats forced to swim. *Archives Medical Research*, Vol. 30, 286-289.
- [25] Khisti R.T., Chopde C.T., 2000. Serotonergic agents modulate antidepressant-like effect of the neurosteroid 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one in mice. *Brain Research.*, Vol. 865, 291-300.
- [26] IUCLID, 1998. Toluene. International Uniform Chemical Information Database, European Commission ISPRA. CD-ROM.
- [27] Frih H., Ali Rachedi B., Djenidi R., Frih N., Tahraoui A., Bairi A., 2010. Le Kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Can J Physiol Pharmacol.*, Vol. 88(7), 733-44.
- [28] Numan M., 1978. Progesterone inhibition of maternal behavior in the rat. *Horm. Behav.*, Vol. 11(2), 209-31.

- [29] Doerr H.K., Siegel H.I., Rosenblatt J.S., 1981. Effects of progesterone withdrawal and estrogen on maternal behavior in nulliparous rats. *Behav. Neural Biol.*, Vol. 32(1), 35-44.
- [30] Clark A.S., Roy E.J., 1985. Behavioral in sensitivity to progesterone during lactation in female rats. *Physiol. Behav.*, Vol. 34(5), 677-82.
- [31] Baulieu E.E., Robel P., Schumacher M., 2001. Neurosteroids: beginning of the story. *Int. Rev. Neurobiol.*, 2001, Vol. 46, 1-32. Review.
- [32] Al-Khouri H., Greenstein B.D., 1985. Progesterone receptors in rat brain and uterus: dependence on the hormonal milieu. *J. Endocrinol.*, Vol. 107(2), 159-62.
- [33] Brown T.J., MacLusky N.J., 1994. Progesterone modulation of estrogen receptors in microdissected regions of the rat hypothalamus. *Mol. Cell. Neurosci.*, Vol. 5(3), 283-90.
- [34] Majewska M.D., 1992. Neurosteroids: endogenous bimodal modulators of the GABA-A receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog. Neurobiol.*, Vol. 38(4), 379-95.
- [35] Kastrop Y., Hallbeck M., Amandusson A., Hirata S., Hermanson O., Blomqvist A., 1999. Progesterone receptor expression in the brainstem of the female rat. *Neurosci. Lett.*, Vol. 275(2), 85-8.
- [36] Numan M., Roach J.K., Del Cerro M.C.R., Guillamo'n A., Segovia S., Sheehan T.P., Numan M.J., 1999. Expression of intracellular progesterone receptors in rat brain during different reproductive states, and involvement in maternal behavior. *Brain Research.*, Vol. 830, 58-371.
- [37] DeBold J.F., Frye C.A., 1994. Genomic and non-genomic actions of progesterone in the control of female hamster sexual behavior. *Horm. Behav.*, Vol. 28(4), 445-53.
- [38] Ramirez V.D., Zheng J., 1996. Membrane sex-steroid receptors in the brain, *Front Neuroendocrinol.*, Vol. 17(4), 402-39. Review.
- [39] Smith S.S., Gong Q.H., Li X., Moran M.H., Bitran D., Frye C.A., Hsu F.C., 1998. Withdrawal from 3alpha-OH-5alpha-pregnan-20-one using a pseudopregnancy model alters the kinetics of hippocampal GABA-A-gated current and increases the GABA-A receptor alpha 4 subunit in association with increased anxiety. *J. Neuroscience.*, Vol. 18(14), 5275-84.
- [40] Mellon S.H., 2007. Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 116, 107-124.
- [41] Concas A., Follesa P., Barbaccia M.L., Purdy R.H., Biggio G., 1999. Physiological modulation of GABA receptor plasticity. A by progesterone metabolites. *European Journal of Pharmacology*, Vol. 375, 225-235.
- [42] Garcia-Segura L.M., Naftolin F., Hutchison J.B., Azcoitia I., Chowen J.A., 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *J. Neurobiol.*, Vol. 40(4), 574-84.
- [43] Mc Ewen B.S., 1999. Gonadal hormone regulation of synaptic plasticity in the brain: What is the mechanism? In *Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system*, E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher (Eds). Humana Press. Contemporary endocrinology, 233-254.
- [44] Toran-Allerand C.D., 1996. Mechanisms of estrogen action during neural development: mediation by interactions with the neurotrophins and their receptors? *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, Vol. 56, 169-78.
- [45] De Nicola A.F., 1993. Steroid Hormones and Neuronal Regeneration. *Advances in Neurology*, Vol. 59, 199-206.
- [46] Désarnaud F., Do Thi A.N., Brown A.M., Lemke G., Suter U., Baulieu E.E., Schumacher M. 1998. Progesterone stimulates the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and P0 genes in Schwann cells. *J. Neurochem.*, Vol. 71(4), 1765-8.
- [47] Baulieu E.E., 1999. Neuroactive neurosteroids: dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulphate. *Acta Paediatr. Suppl.*, Vol. 88(433), 78-80.
- [48] Paul S.M., Purdy R.H., 1992. Neuroactive steroids. *Faseb. Journal*, Vol. 6, 2311-2322.
- [49] Baulieu E.E., 1991. Neurosteroids: A new function in brain. *Biology of the Cell*, 7 Vol. 1, 3-10.
- [50] Robel P., Schumacher M. et Baulieu E.E., 1999. Neurosteroids: From definition and biochemistry to physiopathologic function. In *Neurosteroids: a new regulatory function in the nervous system*, E.E. Baulieu, P. Robel, M. Schumacher (Eds). Humana Press. Contemporary endocrinology, 1-25.
- [51] Landa A.I., Gargiulo A.J., Gargiulo M.M., Cabrera R.J., Bregonzio C., Lafuente Sánchez J.V., Gargiulo P.A., 2009. Alpha and beta noradrenergic mediation of NMDA glutamatergic effects on lordosis behaviour and plasmatic LH concentrations in the primed female rat. *J. Neural. Transm.* Vol. 116(5), 551-7.