

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Badji Mokhtar – Annaba University
Université Badji-Mokhtar Annaba



جامعة باجي مختار عنابة

FACULTE DES SCIENCES
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE

En vue de l'obtention du diplôme de

DOCTEUR ES SCIENCE

En biologie et physiologie animale

Intitulé

**Etude des perturbations neuro-biologiques et
comportementales chez un modèle animal
gonadectomisé**

Présentée par : Mme GUEDRI Kamilia

Devant la commission d'examen :

Président : BOUZERNA Nouredine Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

Examineurs:

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

OUALI Kheireddine Pr. Université Badji Mokhtar - Annaba

BOUDAH Abdennacer MCA Université Mentouri - Constantine

DJENIDI Redha MCA Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi -BBA

Directeur de thèse: FRIH Hacène MCA Université Badji Mokhtar - Annaba

2013/2014

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu de m'avoir donné la santé, le courage et la patience et de m'avoir mis sur le chemin du savoir.

Je remercie, en premier lieu, très vivement monsieur le professeur **FISSON Sylvain** qui a accepté de faire partie du jury et d'apporter ses critiques constructives.

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

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à monsieur le professeur **OUALI Kheireddine** qui nous fait l'honneur de critiquer et d'analyser ce travail.

Je tiens à exprimer mes remerciements à monsieur le docteur **DJENIDI Redha** qui nous honore de sa présence en examinant ce travail.

Je voudrais aussi remercier chaleureusement monsieur le docteur **BOUDAH Abdennacer** qui a bien voulu accepté de juger ce travail.

Je souhaite remercier mon directeur de thèse, monsieur le docteur **FRIH Hacène**, pour le temps conséquent qu'il m'a accordé, ses qualités pédagogiques et scientifiques, sa franchise, sa sympathie, sa bonne humeur, qui ont fait de ces quatre ans une aventure incroyable. J'ai beaucoup appris à ses côtés et je lui adresse ma gratitude pour tout cela ; "Merci beaucoup, Chef !"

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à monsieur le professeur **TAHRAOUI Abdelkrim** qui m'a accueillie au sein de son laboratoire. Il y a de cela de nombreuses années. Je le remercie pour sa compétence et sa disponibilité.

J'associe à ces remerciements toute l'équipe du laboratoire de Neuro-Immuno-Endocrinologie, et mes collègues doctorants particulièrement **Melle Taaya Hakima**, **Mr. Chettoum Aziez**, **Mme Latreche Asma**, **Mr. Selatnia Farid**, **Mme Attoui Nawel**, **Mme Messaoudi Asma** pour tous les échanges techniques, scientifiques et pour leur sympathie, leur aide pendant ces quatre ans de thèse.

Un remerciement particulier à mon cher **Papa**, qui a toujours été fier de moi, pour son soutien sans faille, et à tous ce qu'il a pu m'apporter pour franchir les obstacles les plus difficiles. Je tiens à lui exprimer ma plus vive gratitude pour son aide financière et morale tout au long de ces années d'études. Un immense merci à ma chère **Mama**, ainsi qu'à mes frères **Nacereddine**, **Salah**, **Mohamed** et **Karime**, et à ma Sœur **Djamila** pour leur soutien et aide au cours de ces dernières années et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous remercie aussi d'avoir été présents dans mes moments de doutes et de craquages, de m'avoir remonté le moral et encouragé à ne pas laisser tomber cette thèse.

Mon affection et ma profonde reconnaissance sont adressées à mon cher époux **Azeddine** pour sa patience, son soutien, ses aides et d'avoir été tout simplement là, et à ma chère fille **Reimas** la lumière de ma vie, que Dieu te garde pour nous.

LISTES DES FIGURES

N°	Figure	Page
1	Structure chimique de la cyclosporine A	7
2	Structure chimique du kétoconazole	8
3	A. Dispositif utilisé dans FST	15
	B. Dispositif utilisé dans PM	17
	C. Dispositif utilisé dans OF	19
	D. Dispositif utilisé dans MWM	21
4	Illustration schématique de l'expérimentation	22
5	Variation des populations leucocytaires chez les rats contrôles et traités. A. Leucocytes totaux. B. pourcentages des globules blancs (Lymphocytes, Monocytes et Neutrophiles). (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	24
6	Variation de la testostéronémie chez les rats contrôles et traités. (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	25
7	Observation au microscope optique des coupes histologiques des testicules des rat témoin (A) et de rat traité au CsA (B). (Coloration à H & E, Gr x10).	26
8	Observation au microscope optique des coupes histologiques des testicules de rat traité au KTCZ et de rat traité au CsA + KTCZ (B). (Coloration à H & E, Gr x10).	27
9	Observation au microscope optique des coupes histologiques du thymus des rat témoin (A) et de rat traité au CsA (B). (Coloration à H & E, Gr x10).	28
10	Observation au microscope optique des coupes histologiques du thymus du rat traité au KTCZ (A) et de rat	28

	traité au CsA+KTCZ (B).(Coloration à H & E, Gr x10).	
11	Observation au microscope optique des coupes histologiques des surrénales des rat témoin (A) et de rat traité au CsA (B). (Coloration à H & E, Gr x10).	29
12	Observation au microscope optique des coupes histologiques des surrénales de rat traité au KTCZ (A) et de rat traité au CsA+KTCZ (B). (Coloration à H & E, Gr x10).	29
13	Variation des paramètres de labyrinthe de Morris au 7 ^{ème} et 14 ^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités. (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	31
14	Variation des paramètres de la nage forcée chez les rats contrôles et traités. (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	37
15	Variation des paramètres de test des champs ouverts chez les rats témoins et traités. A. Distance totale parcouru (cm); B. Nombre de redressements; C. Nombre d'entrées au centre; D. Temps d'immobilité (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).	38

LISTES DES TABLEAUX

N°	Tableau	Page
01	Répartition des animaux selon le protocole expérimental.	06
02	Variation du poids corporel, et poids relatif des organes chez les rats témoins et traités.	22
03	Variation des paramètres de test de labyrinthe en croix surélevé chez les rats Témoins et traités.	33

LISTE DES SYMBOLES

- 5 HT**: 5-Hydroxytryptamine
- ACTH** : Adreno corticotropin hormon
- ANOVA**: Analyse de la variance ou ANalysis Of Variance
- BDNF**: Brain-derived neurotrophic factor
- CRF** :Corticotrophin Releasing Factor
- CRH** : Corticotrophin Releasing Hormone
- CsA**: Cyclosporine A
- FSH** : Folliculo stimulating hormon
- GABA**: Acid gamma aminobutyrique
- GH** : Growth Hormone
- GnRH**: Gonadotrpın releasing hormon
- GR** : Récepteurs aux glucocorticoïdes
- GRM**: Globules rouges du mouton
- HHS**: Hypothalamo-hypophyso-surrénalien
- Ig**: Immunoglobuline
- IL** : Interleukin
- INF** : Interféron
- KTCZ** : Ketoconazole
- LCR**: Liquide céphalo rachidien
- LH** : luteinising hormon
- LPS** : lipopolisaccharide
- MWM**: Morris Water Maze
- OF**: Open Field
- PM**: Place Maze
- TNF**: Tumor nicrosis factor
- T**: Témoin
- TrkB**: The receptor tyrosine kinase

TABLE DES MATIRES

I.INTRODUCTION GENERALE.	- 1 -
II. MATERIEL ET METHODES	- 5 -
II.1. Matériel biologique	- 5 -
II.1.1. Elevage et lotissement des animaux	- 5 -
II.2. Méthodes	- 7 -
II.2.1. Application des traitements des animaux	- 7 -
II.2.1.1. Traitement par la cyclosporine A	- 7 -
II.2.1.2. Administration du Kétoconazole	- 8 -
II.2.2. Préparation des prélèvements	- 9 -
II.2.2.1. Décapitation et prélèvement sanguin	- 9 -
II.2.2.2. Dissection et prélèvement des organes	- 9 -
II.2.3. Etude Histologique	- 9 -
II.2.3.1. Fixation	- 9 -
II.2.3.2. Déshydratation	- 10 -
II.2.3.3. Inclusion	- 10 -
II.2.3.4. Confection des coupes	- 10 -
II.2.3.5. Coloration	- 10 -
II.2.3.6. Montage	- 12 -
II.2.4. Dosage de la testostérone plasmatique par ELISA	- 12 -
II.2.5. Etude comportementale	- 13 -
II.2.5.1. Procédure de la nage forcée (Forced Swimming Test)	- 13 -
a-Description du test	- 14 -

b- Variables mesurées.....	- 15 -
II.2.5.2. Procédure du labyrinthe en croix surélevée (Place Maze Test).	15 -
a- Description du test.....	- 15 -
b- Dispositif utilisé.....	- 16 -
c- Variables mesurées.....	- 17 -
II.2.5.3. Procédure des champs ouverts (Open Field test)	- 18 -
a. Description du test.....	- 18 -
b. Dispositif utilisé.....	- 19 -
c. Variables mesurées.....	- 19 -
II.2.5.4. Procédure de Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water Maze Test)	- 20 -
a. Dispositif expérimental.....	- 20 -
b. Protocole et variables mesurés.....	- 21 -
II.2.6. Analyse statistique des résultats	- 22 -
III. RESULTATS.....	- 24 -
III.1. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres biologiques	- 24 -
III.1.1. Evaluation de l'état pondéral	- 24 -
III.2. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres Hématologiques	- 25 -
III.3. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres Biochimiques.....	- 27 -
III.3.1. Variation de niveau de la testostérone plasmatique (ng/ml) chez les rats témoins et traités.....	- 27 -
III.4. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des organes... -	27 -
III.4.1. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des testicules..-	27 -
III.4.2. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique du thymus-	29 -
III.4.3. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des surrénales-	30 -

III. 5. Effet de la CsA et KTCZ sur le comportement.....	- 32 -
III.5.1. Effets du kétoconazole et de la cyclosporine A sur la capacité mémorative au cours du teste de labyrinthe de Morris.....	- 32 -
III.5.2. Effet de KTCZ et CsA sur le degré d'anxiété au cours du test de labyrinthe en croix surélevé	- 34 -
III.5.3. Effets du traitement aux KTCZ et CsA sur l'état dépressif au cours de test la nage forcée (FST).....	- 36 -
III.5.4. Effet des KTCZ et CsA sur l'activité locomotrice au cours du test des champs ouverts.	- 37 -
IV. DISCUSSION.....	- 39 -
V. CONCLUSION.....	- 54 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 55 -

RESUME:

La cyclosporine (CsA), un décapeptide cyclique lipophile neutre est utilisé avec succès dans la médecine de transplantation et dans le traitement des maladies auto-immunes telles que l'uvéite, l'arthrite rhumatoïdale et le psoriasis. Cependant, il a été rapporté que l'administration de la CsA (20mg/kg) provoque un dysfonctionnement aussi bien au niveau gonadotrope que neuro-comportemental. L'objectif de notre étude est de proposer une stratégie thérapeutique basée sur le traitement combiné CsA tout en s'appuyant sur l'hypothèse du rôle central de la boucle de régulation corticostérone-cytokines pro-inflammatoires dans l'apparition des troubles liés à l'administration de la CsA. Le kétoconazole (KTCZ), un antifongique actif par voie orale, a été choisi dans notre étude, de par ses propriétés neuro-comportementales (antidépresseur et anxiolytique) et physiologique (anti-gonadotrope et corticobloquant).

Dans notre étude, nous avons procédé à l'administration combinée de la CsA (en IP) et du KTCZ (voie orale) pendant 14 jours successifs chez des rats mâles Wistar subissant subséquentement le test de nage forcée (FST). Le test de la nage forcée chez les rats est un modèle comportemental pré-clinique qui possède une bonne validité prédictive et est largement utilisé pour déterminer l'efficacité des médicaments antidépresseurs (ADS). En plus des investigations histo-pathologiques classiques des organes cibles (testicules, thymus, surrénales), des tests comportementaux neuropharmacologiques ont été utilisés dans cette étude, notamment le test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze test) pour mesurer le degré d'anxiété de l'animal, le test des champs ouverts (Open field test) pour évaluer l'activité locomotrice et le test du labyrinthe de Morris (Morris water maze) pour apprécier les capacités mémoratives de l'animal.

Nos résultats ont signalés que l'injection intra péritonéale de la CsA (20mg/kg) provoque des dommages testiculaires associés à une diminution de la testostéronémie, hyperplasie de la corticosurrénale et dégénérescence lobulaire thymique. Au niveau comportemental, nous avons enregistré une amélioration nette de l'apprentissage de mémoire ainsi qu'un effet antidépresseur et anxiolytique. Des résultats similaires ont été retrouvés suite à l'administration du KTCZ. Cependant, nous avons signalé hypertrophie thymique, une hyperplasie de la médullo-surrénale et des troubles de la mémoire.

Le traitement combiné CsA+KTCZ a provoqué une réparation à tout les niveaux testiculaire, thymique, surrénalienne, hormonale et comportemental.

Mots Clés: Ketoconazole, cyclosporine, dommages testiculaire, comportement, rat.

ABSTRACT

Cyclosporine (CsA) , is a neutral lipophilic decapeptide cyclic and he was successfully used in transplant medicine and in the treatment of autoimmune diseases such as uveitis, psoriasis and rheumatoid arthritis . However, it has been reported that the administration of CsA (20mg/kg) causes a dysfunction at both gonadotropic that neurobehavioral . The objective of our study is to propose a therapeutic strategy based on the combined CsA treatment while relying on the assumption of the central role of corticosterone - pro-inflammatory cytokines in the development of disorders induced by the administration of CsA . Ketoconazole (KTCZ), an orally active antifungal , was chosen in our study, with its neuro- behavioral properties (antidepressant and anxiolytic) and physiological (anti- gonadotropic and corticoblocking). .

In our study, we performed the combined CsA administration (IP) and KTCZ (oral) for 14 consecutive days in male Wistar rats subsequently the forced swim test (FST). The forced swimming test in rats is a preclinical behavioral model has good predictive validity and is widely used to determine the effectiveness of antidepressant drugs (ADS) . In addition ,conventional histopathological investigations in target organs (testes , thymus, adrenal) , neuropharmacological behavioral tests were used in this study, including the measure of the anxiety degree of the animal by the elevated place maze test, measure of the locomotor activity by the open fields test the and the use of Morris water maze test to assess the capacity of rat memory.

Our results indicated that the intraperitoneal injection of CsA (20mg/kg) cause testicular damage associated with a decrease in testosterone , adrenal cortical hyperplasia and lobular thymic degeneration. At the behavioral level , we recorded a significant improvement in learning and memory that an antidepressant and anxiolytic effect . Similar results were found following administration of KTCZ . However, we reported thymic hypertrophy , adrenal medulla hyperplasia and memory disorders .

The combined treatment CsA + KTCZ induced a repair in all levels in testicular , , adrenal , Thymic , hormonal and behavior disorders.

Keywords: Ketoconazole, cyclosporine, testicular damage, behavior, rat.

الملخص

السيكلوسبورين (CsA) هو عشاري ببتيد دوري محب للدهون متعادل، استخدم بنجاح في زراعة الاعضاء و في علاج أمراض المناعة الذاتية مثل التهاب القزحية ، والصدفية والتهاب المفاصل الروماتويدي. ومع ذلك، فقد أفيد أن استخدامه (20 mg/kg) يؤدي إلى خلل وظيفي في الغدد التناسلية والسلوك العصبي .

الهدف من دراستنا هو اقتراح استراتيجية علاجية مبنية علي الاعتماد على الدور المركزي لحلقة الكورتيكسترون- السيتوكينات الموالية للالتهابات في علاج الاضطرابات الناتجة عن استخدام السيكلوسبورين. وقد تم اختيار الكيتوكونازول (KTCZ) مضاد فطريات نشيط في دراستنا هذه نظرا لخصائصه السلوكية العصبية (المضادة للاكتئاب و الرهاب) والفسولوجية (مثبط للغدة التناسلية و القشرة الكظرية) . في دراستنا ، استخدمنا السيكلوسبورين عن طريق الحقن تحت الصفاق (IP) و الكيتوكونازول (عن طريق الفم) لمدة 14 يوم متتالية في فئران ويستار الذكور يخضعون لاحقا لاختبار السباحة القصري (FST) . اختبار السباحة القصري في الفئران هو نموذج سلوكي سريري لديه صلاحية جيدة ، ويستخدم على نطاق واسع ل تحديد مدى فاعلية العقاقير المضادة للاكتئاب (ADS) .

بالإضافة إلى التحقيقات علي مستوى الأنسجة المستهدفة (الخصيتين، الغدة الصعترية والغدة الكظرية) ، اجرينا اختبارات سلوكية عصبية ، تتمثل في اختبار عبر متاهة مرتفعة لقياس درجة القلق عند الفئران و اختبار الحقل المفتوحة لتقييم النشاط الحركي و ايضا اختبار متاهة موريس لتقييم الذاكرة عند الحيوان. وأشارت نتائجنا أن حقن السيكلوسبورين (20 mg/kg) يسبب ضررا في الخصية يرتبط مع انخفاض في هرمون التستوستيرون، و تضخم الغدة الكظرية وضمور في فصوص الغدة الصعترية. و على المستوى السلوكي ، سجلنا تحسنا كبيرا في التعلم و الذاكرة و ايضا زوال للاكتئاب و القلق . كما تم العثور على نتائج مماثلة عند المعالجة بالكيتوكونازول KTCZ. باستثناء تضخم الغدة الصعترية ، و تضخم نخاع الغدة الكظرية و سجلنا ايضا اضطرابات في الذاكرة.

و اخيرا من خلال هذه الدراسة يمكن القول ان العلاج جنبا إلى جنب السيكلوسبورين+ الكيتوكونازول يؤدي الى إصلاح على كافة المستويات الهرمونية والسلوكية و العضوية عند الفئران .

الكلمات المفتاحية: الكيتوكونازول، السيكلوسبورين، السلوك، اضرار في الخصية ، فار.

I. INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, les greffes de la moelle osseuse et des organes sont réalisées avec succès. Mais les réactions de rejet se produisent quand un organe étranger est attaqué par le système immunitaire du corps du patient transplanté. De nombreux médicaments immunosuppresseurs sont utilisés pour prévenir les réactions de rejet, dont le prototype est la cyclosporine A (CsA) (**Gaffari et al., 2010**).

La CsA, un décapeptide cyclique lipophile neutre ($C_6H_{11}N_{11}O_{12}$), a été isolée à partir d'un champignon, *Tolypocladium inflatum*. Bien qu'au début il ait été d'abord identifié en 1976 comme agent antibiotique, par la suite il a été découvert comme agent immunosuppresseur puissant (**Borel et al., 1976**). Il est utilisé avec succès dans la médecine de transplantation et dans le traitement des maladies auto-immunes telles que l'uvéïte (**Nusseblatt, 1987**), l'arthrite rhumatoïdale (**Yoshinoya et al., 1988**) et le psoriasis (**Mihatsch et Wolff, 1992**).

L'effet immunosuppresseur puissant de la CsA est attribuée à sa fonction spécifique inhibitrice sur la génération de lymphokines, de différenciation et de voie de transduction du signal des récepteurs des cellules T (**Rezzani , 2004; Rezzani , 2006**).

Cependant, il a été rapporté que l'administration d'une dose-dépendante de la CsA (20mg/kg ou plus) provoque une diminution du poids des organes reproducteurs de rats mâles (**Seethalakshmi et al., 1987; Seethalakshmi et al., 1990b**) ainsi que des dommages testiculaires (**Sirinivas et al., 1998; Masuda et al., 2003 ; Türk et al., 2007**).

En plus de la prévention du rejet d'allogreffe, la CsA présente une variété d'activités biologiques, y compris anti-fongique, anti-inflammatoire, immunosuppressive, et des propriétés anti-parasitaires (**Beauchesne et al., 2007**). Ainsi, des niveaux sériques élevés de CsA peuvent induire une neurotoxicité (**Kunzendorf et al., 1988; Gottrand et al., 1991**). De plus, la CsA stabilise la membrane mitochondriale neuronale et empêche la libération des facteurs apoptogènes dans le cytosol. En outre, des études récentes ont démontré que la CsA exerce un rôle neuroprotecteur (**Butcher et al., 1997**;

Friberg et al., 1998), ainsi que des effets trophiques (**Borlongan et al., 1999; Dawson et al., 1995**), et modifie l'activité comportementale chez les animaux normaux et les modèles humains qui ont des maladies du trouble neurodégénératif (**Borlongan et al., 1996; 1997; 1999**). En effet, il a été trouvé que la CsA est une protection contre l'épuisement dopaminergique chez le modèle animal parkinsonien (**Kitamura et al., 1994, Matsuura et al., 1997**). Ainsi, la CsA est à la fois un puissant outil pour élucider les mécanismes neurotrophiques et un potentiel agent thérapeutique dans les troubles du cerveau, tels que la maladie d'Alzheimer (**Borlongan et al., 2000**).

Le traitement des patients à la CsA provoque des effets secondaires neuropsychologiques, y compris des modifications dans les réponses émotionnelles (**Kahan et al., 1994**). Cependant, les traitements immunosuppresseurs cliniques utilisant la CsA induisent des changements dans l'état mental des patients (**Mason, 1990**) dans 20% des transplantations des greffes des reins (**Kahan et al., 1987**) et du foie (**De Groen et al., 1987**). Donc les études chez les rongeurs sont nécessaires pour étudier les troubles affectifs induits par la CsA.

Chez les rats Wistar, **Hirano et al (1994)** ont rapporté que le traitement à la CsA, à des doses proches de celles utilisées pour l'immunosuppression chez les patients transplantés, diminue de façon significative la réponse immédiate des glucocorticoïdes au stress du froid (cold stress). Chez le rat, la CsA pourrait affecter la thermorégulation (**Yüce et al., 2008**). Ainsi, les animaux traités avec ce médicament pourraient afficher une baisse d'activité liée à l'hypothermie où le traitement à la CsA induit ce qui est appelé un sickness behavior ou comportement de maladie (**Rezzani, 2004**). Les chercheurs attribuent ce comportement aux cytokines proinflammatoires, en particulier l'interleukine-1 (IL-1). Comme la CsA ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique intacte (**Faulds et al., 1993; Kahan et al., 1989**), les effets de la CsA sont probablement susceptibles d'entraîner la perception des niveaux de cytokines modifiées par le système nerveux central comme il a été démontré pour l'IL-1 (**Besedovsky et Del Rey, 1996; Laye et**

al., 1995). Le système nerveux central (SNC) et le système immunitaire (SI) interagissent via des voies afférentes et efférentes (**Madden et Felten, 1995**).

Le domaine de la recherche qui s'intéresse aux interactions entre SNC et SI est appelé psycho-neuro-immunologie. Depuis l'avènement de cette discipline (**Ader, 1981**), une série de travaux de recherche échelonnés a démontré que les désordres mentaux, en l'occurrence la dépression, n'étaient pas sans liens avec les modifications des fonctions immunitaires et inflammatoires sous-jacentes, et affectent les réponses de l'organisme aux agressions éventuelles de tout ordre (**Tecoma et Huey, 1985; Herbert et Cohen, 1993; Makino et al., 1998; Maes et al., 1999; Deak et al., 2003**). En effet, les malades déprimés ont fait et font toujours l'objet de nombreuses études en Psycho-Neuro-Immunologie. Au départ, il s'agissait essentiellement de tester l'hypothèse d'une relation entre la dépression mentale et la baisse des défenses immunitaires. Certains auteurs ont pu observer que les patients déprimés présentent en général une lymphopénie, une réduction des réponses lympho-prolifératives aux mitogènes non spécifiques et une baisse de l'activité cytotoxique des cellules NK (**Zorilla et al., 2001**).

Cependant, des données récentes montrent que, malgré la relative disparité des résultats obtenus, les patients déprimés ne présentent pas toujours une immunodépression généralisée, comme le laissent penser les travaux sur les effets du stress sur les réponses immunes, puisqu'on peut parfois noter des signes d'activation du système immunitaire au niveau de l'immunité acquise (**Maes et al., 1999**). Ces observations, jointes aux données disponibles quant aux effets sur l'humeur et le comportement des cytokines proinflammatoires libérées par les monocytes et les macrophages, ont permis de proposer la théorie macrophagique de la dépression, qui attribue à cette activation immune un rôle dans la physiopathologie de la dépression (**Smith, 1991**).

Par ailleurs, sachant que des niveaux élevés de cortisol peuvent jouer un rôle dans les anomalies observées dans la dépression (**Holsboer, 2001 ; Frih et al., 2009**), l'utilisation des inhibiteurs de la biosynthèse de cortisol, par exemple, une forte dose de kétoconazole (KTCZ), ont été employés comme

stratégie de traitement des épisodes dépressifs (**Murphy et al., 1991 ; Wolkowitz et al., 1993**).

Le KTCZ, un antifongique actif par voie orale, a été signalé pour le premier à avoir une activité contre le cancer de la prostate il y a près de 20 ans (**Trachtenberg et al., 1983**). Le KTCZ abaisse le cortisol plasmatique chez l'homme et la corticostérone plasmatique chez le rat, en empêchant diverses étapes de la synthèse surrénalienne des corticoïdes et en agissant en tant qu'antagoniste des récepteurs stéroïdes (**Sonino 1987**). Il a été rapporté que le KTCZ réduit l'immobilité dans le test de la nage forcée (effet antidépresseur-like) et l'anxiété dans le test du labyrinthe en croix surélevée (**Frih et al., 2010**).

Dans notre étude, nous avons opté pour une démarche expérimentale en se basant sur l'hypothèse du rôle central de la boucle de régulation corticostérone-cytokines pro-inflammatoires dans l'apparition des troubles anxieux liés à l'administration de la CsA. Nous avons procédé à l'administration combinée de la CsA (en IP) et du KTCZ (voie orale) pendant 14 jours successifs chez des rats mâles Wistar subissant subséquemment le test de nage forcée (FST). Le test de la nage forcée chez les rats est un modèle comportemental pré-clinique qui possède une bonne validité prédictive et est largement utilisé pour déterminer l'efficacité des médicaments antidépresseurs (ADS) (**Borsini et Meli, 1988**).

En plus des investigations histo-pathologiques classiques des organes cibles (testicules, thymus, surrénales), des tests comportementaux neuropharmacologiques ont été utilisés dans cette étude, notamment le test du labyrinthe en croix surélevée (Elevated plus maze test) pour mesurer le degré d'anxiété de l'animal, le test des champs ouverts (Open field test) pour évaluer l'activité locomotrice et le test du labyrinthe aquatique de Morris (Morris water maze) pour apprécier les capacités mémoratives de l'animal

II. MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique

II.1.1. Elevage et lotissement des animaux

Notre matériel biologique est le rat mâle blanc *Ratus ratus* de la souche Wistar, âgés de 6 mois et de poids moyen de $250\text{g} \pm 10\text{g}$ provenant de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les animaux sont élevés dans des cages polyéthylène. Ils subissent une période d'adaptation de 4 semaines dans les conditions environnementales de la salle d'expérimentation (photopériode naturelle, humidité, température). Leur nourriture est composée de maïs, d'orge, de lait et de compléments vitaminés (GAE: Groupe Agricole de l'Est, El Harrouch). L'eau de boisson est servie dans des biberons ad libitum.

Les rats sont soumis à un régime photopériodique naturel. En raison de l'extrême susceptibilité des systèmes de riposte au stress à toutes sortes d'agressions, nous avons attaché la plus grande importance aux conditions de manipulations journalières et à l'environnement où les bruits sont atténués. Les animaux sont manipulés par le même expérimentateur. Les animaux ont été répartis au hasard en quatre groupes expérimentaux de huit rats chacun (**Tab.01**) et ont reçu les traitements suivants:

Le groupe contrôle ou le groupe témoin (T): a reçu une injection sous-cutanée quotidienne de 1 ml d'huile d'olive.

Le Groupe CsA: a reçu durant 14 jours, une injection intra péritonéale de 0,2 ml de CsA à raison de (20mg/kg) dilué dans l'huile d'olive.

Le groupe KTCZ: a reçu durant 14 jours, par voie orale, 2 ml d'une solution saline de KTCZ à raison de 25 mg/kg.

Le groupe CsA+KTCZ: a reçu des injections intra-péritonéales de CsA et une administration orale de KTCZ quotidienne pendant 14 jours.

Tableau 01: Répartition des animaux selon le protocole expérimental.

Traitement	Lots
Injection sous-cutanées quotidiennes de 1 ml d'huile d'olive	T
Injection intra péritonéale de 0,2 ml de CsA + huile d'olive pendant 2 semaines.	CsA (20mg/kg)
Administration per os de 2 ml d'une solution saline isotonique + KTCZ pendant 2 semaines.	KTCZ (25mg/kg)
Injections intra-péritonéales de CsA et administration orale de KTCZ pendant 2 semaines.	KTCZ+CsA

II.2. Méthodes

II.2.1. Application des traitements

II.2.1.1. Traitement par la cyclosporine A

La Cyclosporine est un agent immunosuppresseur dont l'utilisation thérapeutique, dès le début des années 1980, a permis un essor considérable du domaine de la transplantation d'organes en prévenant le rejet aigu des allogreffes. Aujourd'hui encore largement employée en transplantation (peau, cœur, rein, poumons, pancréas, moelle osseuse, intestin grêle), quoique concurrencée par des molécules plus récentes, la Cyclosporine A est la forme principale du médicament. Il s'agit d'un peptide cyclique de onze acides aminés synthétisé par un champignon microscopique, *Tolypocladium inflatum*. Elle comporte des acides aminés dextrogyres, rarement rencontrés dans la nature (**Fig 1**).

La Cyclosporine A (CsA) possède des propriétés immunorégulatrices par inhibition de l'activation des deux lymphocytes B et T (**Hess et al, 1982**)

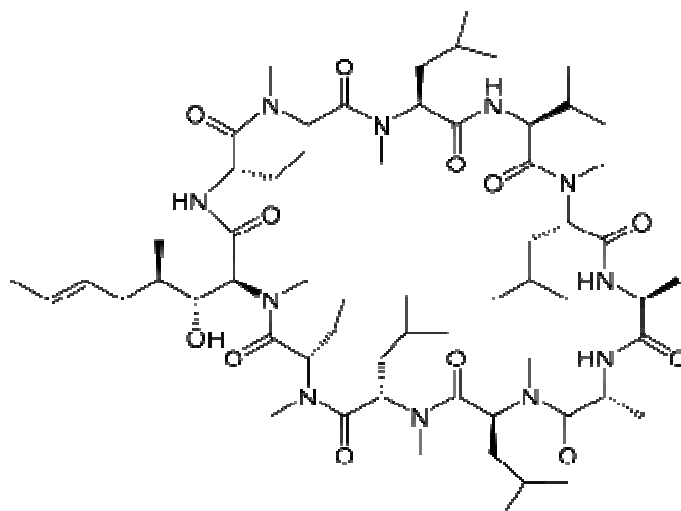


Figure 1 : Structure chimique de la cyclosporine A.

La CsA utilisée provient de chez Sandoz Ltd (Bâle, Suisse). Dans notre étude, elle a été injectée par voie intra péritonéale à une dose de 20 mg / kg.

Cette dose a été choisie après un essai de 2 doses différentes dans notre laboratoire (10 mg/kg et 20 mg/kg).

II.2.1.2. Administration du Kétoconazole

Le Kétoconazole (KTCZ), dérivé de l'imidazole, est un agent antimycotique et un inhibiteur potentiel de la stéroïdogénèse surrénalienne et gonadique (**Santen et al., 1983**) (**Fig 2**). Une dose élevée (25 mg/kg) KTCZ augmente significativement le taux plasmatique d'ACTH chez les rats normaux et inhibe la production des stéroïdes surrénaliens (cortisol et corticostérone).

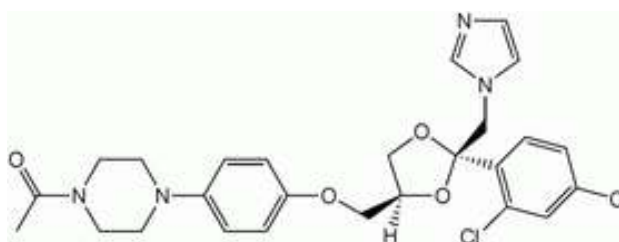


Figure 2: Structure chimique du kétoconazole

Dans notre étude, le KTCZ (25 mg/kg) dilué dans du NaCl à 0.9 %, a été administré par gavage tous les jours, le matin à la même heure, pendant 14 jours. Au cours de la nage forcée, les rats vont subir 2 sessions de tests espacées de 24 heures : le pré-test (d'une durée de 15 minutes) et le test (5 minutes). Le KTCZ est injecté en i.p à raison de 25 mg/kg (**Porsolt et al., 1977 ; Alexandro Da Silva, 2007**). Les rats reçoivent une première injection ½ heure après le pré test ; une seconde injection 5 heures avant le test, et enfin une 3^{ème} injection une heure avant le test.

Le KTCZ (Nizoral) a été obtenu à partir de la société pharmaceutique Janssen-Cilag (Beerse, Belgique).

II.2.2. Préparation des prélèvements

II.2.2.1. Décapitation et prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins se font par ponction rétro orbitaire avant le traitement et au 14^{ème} jour de traitement le matin à 9h. Le sang a été recueilli dans les tubes héparines pour la détermination de l' FNS (Formule de Numération Sanguine). Les lectures ont été prises rapidement au compteur automatique de cellules sanguines PCE-210N multiparamètres (18 paramètres; Erma, Tokyo, Japon). En outre, une goutte de sang déposée sur une lame et étalée rapidement a servi au recomptage de certains points par la méthode de May–Grunwald–Giemsa, afin de vérifier la fiabilité de l'appareil. Il est à souligner que l'hématocrite a été contrôlée tout au long des prélèvements puis centrifugés à 4500 tours /minute pendant 15 minutes. Le sérum est séparé en trois fractions dans des tubes *Eppendorf* puis mis au congélateur jusqu'au moment du dosage hormonale du testostérone plasmatique.

II.2.2.2. Dissection et prélèvement des organes

Les rats ont été sacrifiés sous une légère anesthésie à l'éther à l'issue du traitement (14^{ème} jour). L'animal est fixé en décubitus dorsal, une incision est pratiquée depuis l'orifice urogénital jusqu'au manubrium sternal. Les testicules, le thymus et les surrénales sont rapidement prélevés sous glace à l'aide de pinces fines, pesés au moyen d'une balance de précision [Scaltec Instruments, Germany] puis fixés au formol pour la réalisation des coupes histologiques.

II.2.3. Etude Histologique

Nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des organes de reproduction et de l'immunité. Ces organes sont prélevés après décapitation, sont conservés dans du Formol. La technique histologique utilisée est celle décrite par **Martoja et Martoja (1967)**.

II.2.3.1. Fixation

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique, elle a pour but d'immobiliser les structures en respectant leur morphologie et en

les conservant. Dans notre étude, nous avons utilisé comme fixateur le formol. L'utilisation de ce fixateur a pour avantage de durcir l'échantillon étudié sans le contracter et de ce fait sans l'abîmer.

II.2.3.2. Déshydratation

Une fois le fixateur éliminé par un rinçage à l'eau distillée, nous sommes passés à l'étape de la déshydratation dans un automate qui immerge successivement dans:

- 7 bacs d'éthanol à 100%;
- 3 bacs de xylène;
- 2 bacs de paraffine chauffée à 70°C.

Nous avons placé les pièces à l'étuve et nous avons laissé s'évaporer le xylène progressivement; la durée de la déshydratation est de 17 heures.

II.2.3.3. Inclusion

Les pièces sont immergées dans de la paraffine fondue dans une étuve pendant 8 heures.

II.2.3.4. Confection des coupes

Les blocs de paraffine sont préalablement taillés avant de subir la coupe au microtome (GTU " Tissue-Tek") à une épaisseur de 4 à 5 μ . Les coupes sont ensuite collées sur des lames préalablement recouvertes de gélatine. Les lames sont placées sur une plaque chauffante afin de déplier le ruban. Après refroidissement, on procède à la coloration

II.2.3.5. Coloration

Il existe plusieurs techniques de coloration qui varient en fonction des tissus. La méthode à l'Hématéine et à l'Eosine (H et E) est la plus utilisée à cause de la distinction qui peut être faite entre le cytoplasme et le collagène: le cytoplasme apparaît en rose, tandis que le collagène se colore en jaune orangé.

Solution

- Alcool acide

- Alcool éthylique à 70%: 1000ml
- Acide chlorhydrique concentré: 5ml
- Eau ammoniacale
 - Eau distillée: 1000ml
 - Ammoniaque: 2ml
- Eosine Y
 - Eosine Y, solution aqueuse à 3%: 100ml
 - Alcool éthylique à 95%: 125 ml
 - Eau distillée: 357ml
 - Acide acétique glacial: 2gouttes

Mode opératoire

- Déparaffiner et hydrater les coupes à l'eau du robinet
- Rincer à l'eau distillée
- Colorer avec l'hématéine de Harris (15 min)
- Laver les coupes à l'eau du robinet
- Différencier les coupes dans l'alcool acide (1 à 2 plongées); déposer ensuite la lame dans un bain d'eau du robinet et vérifier au microscope la différenciation. Les noyaux doivent être rouges et le fond clair.
- Laver à l'eau du robinet (2 à 3 min)
- Bleuir dans l'eau ammoniacale
- Laver à l'eau du robinet (15 min)
- Colorer dans la solution d'éosine (15 sec à 2 minutes); l'éosine ne doit produire qu'une coloration cytoplasmique franche et donner une gamme de rose plus vif, selon l'intensité de l'acidophilie des divers éléments
- Déshydratation sur lame, éclaircir et monter à l'Eukitt

Résultats

- Noyaux: bleu
- Cytoplasme: rose
- Fibres conjonctives (surtout le collagène): d'un rose tirant vers l'orangé
- Globules rouges: rouge claire à jaune, selon la teinte de l'éosine

II.2.3.6. Montage

Le montage " lame-lamelle" se fait en déposant une goutte d'Eukitt au milieu de la lamelle.

II.2.4. Dosage de la testostérone plasmatique par ELISA.

La testostérone est une hormone sexuelle mâle produite essentiellement à 95% par les cellules de Leydig des testicules, mais une faible quantité (5 %) est sécrétée également par la corticosurrénale. Chimiquement, la testostérone est un stéroïde en C19. La première étape de la biosynthèse des stéroïdes débute par la conversion du cholestérol en pregnénolone.

II.2.4.1 Principe du test

Le test ELISA est un examen de laboratoire appelé en anglais: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. L'ELISA est une technique biochimique, principalement utilisée en immunologie afin de détecter la présence d'un anticorps ou d'un antigène dans un échantillon. La procédure est basée sur le principe de compétition entre deux antigènes (antigène marqué par une enzyme et antigène non marqué présent dans l'échantillon) vis-à-vis d'anticorps spécifiques recouvrant les puits des microplaques. Le taux d'antigènes marqués lié aux anticorps est inversement proportionnel à la concentration de l'hormone à doser. L'antigène non marqué présent dans l'échantillon déplace une partie des antigènes marqués durant la phase de fixation à l'anticorps. Dans toutes ces réactions, il se crée un équilibre dynamique. Après un lavage qui élimine les anticorps non fixés, les complexes anticorps-antigènes ainsi marqués sont révélés par addition du substrat TMB.

L'absorbance, mesurée à 450nm, est inversement proportionnelle à la concentration de testostérone de l'échantillon. Les dosages des échantillons sont réalisés en comparant l'absorbance obtenue pour les échantillons à une courbe étalon préparée à partir de standards de concentration connue.

1. Pipeter respectivement 10 µl de la solution standard, contrôle et échantillon dans les puits de microplaque;
2. Pipeter 100 µl du conjugué enzymatique fraîchement préparé dans chaque puits ;

3. Pipeter 50 µl d'antisérum de la testostérone dans chaque puits;
4. Incuber 90 minute à la 37C° à l'étuve;
5. Eliminer le contenu des puits de la microplaque en procédant au lavage 5 temps, 2 cycles avec 250 µl de la solution tampon de lavage diluée. Le lavage se fait à l'aide d'un appareil TECAN Washer Columbus/ Columbus Pro;
6. Pipeter 100µl de solution substrat TMB dans chaque puits ;
7. Incuber 20 minutes à la température ambiante (20-25 C°);
8. Arrêter la réaction enzymatique en ajoutant 100µl de solution d'arrêt TMB dans chaque puits. Agiter légèrement, la couleur change de bleu à jaune;
9. Lire la densité optique sur un spectrophotomètre à 450 nm dans les 10 minutes suivant l'addition de la solution d'arrêt.

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

II.2.5. Etude comportementale

II.2.5.1. Procédure de la nage forcée (Forced Swimming Test)

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

dépressif de Porsolt induit des réponses comportementales que nous tenterons de détailler dans notre travail.

a- Description du test

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

Le test consiste à placer individuellement le rat dans un aquarium de 40 cm de haut sur 30 cm de large. Ces dimensions permettent de s'assurer que le rat ne pourra pas s'enfuir en s'agrippant aux bordures du dispositif. L'aquarium est rempli d'eau à 25 C°. La hauteur de l'eau atteint 35 cm, pour s'assurer que le rat ne se serve pas de ses membres inférieurs pour se maintenir à la surface, et donc l'obliger à nager (**Fig 3.A**). Après une phase d'activité vigoureuse (temps d'adaptation), l'animal contrôle cesse de nager et se fige, adoptant un comportement de désespoir. On considère que l'animal est immobile lorsqu'il flotte en position horizontale et ne réalise que des mouvements de faible amplitude, suffisant à maintenir sa tête hors de l'eau.

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

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



Figure 3. A. Dispositif utilisé dans le FST

b- Variables mesurées

Les différentes variables mesurées durant le FST sont :

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

II..2.5.2. Procédure du labyrinthe en croix surélevée (Place Maze Test).

a- Description du test

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

conflit de mesure du risque et qui présentent des homologies avec l'expression humaine de l'anxiété (**Albrechet-Souza et al., 2007**).

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

b- Dispositif utilisé

Le dispositif est en forme de croix et élevé à une hauteur de 40 à 60 cm du sol. Il se compose d'une partie centrale (10 × 10 cm), de deux bras protégés ouverts sans parois (50 × 10 × 50 cm) qui s'opposent à deux autres bras, perpendiculaires aux précédents, fermés par des parois (**Fig.3.B**). Le test dure 10 minutes et débute lorsque le rat est placé au centre du labyrinthe, face à un bras ouvert. Cette procédure est celle employée initialement par **Pellow et al. (1985)**.

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

ouverts sera décrit comme étant «peu anxieux» et un animal qui reste confiné dans les bras fermés du dispositif, sera lui, décrit comme étant «anxieux».

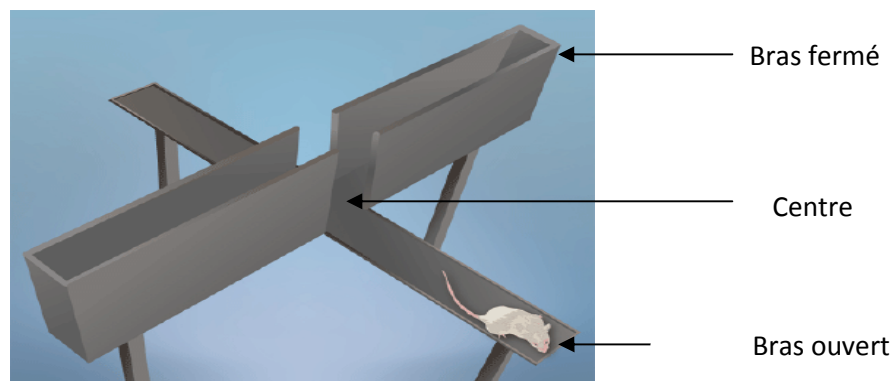


Figure 3. B. Dispositif utilisé dans PM

c- Variables mesurées

Durant ce test, les variables mesurées sont : Temps au centre (Sec) ; Temps dans les bras ouverts (Sec) ; Temps dans les bras fermés (Sec); Entrées dans les bras ouverts; Entrées dans les bras fermés; Nombre total d'entrées dans les bras; Nombre de redressements; Nombre de prises d'information sur les profondeurs; Nombre de postures d'attention étirée (SAPs). Deux types de variables sont relevés : des variables classiques (**Lister, 1987 ; Pellow et al., 1985**) et des variables plus éthologiques tirées du répertoire comportemental défensif des rongeurs (**Rodgers et Johnson, 1995**).

Parmi les variables classiques, nous avons mesuré le temps passé dans les différentes parties du dispositif, le nombre d'entrées dans les bras fermés et dans les bras ouverts, ainsi que dans leurs parties distales. Le nombre de redressements a également été relevé. A partir de ces données, nous avons calculé le nombre total d'entrées dans les bras. De plus, pour obtenir une mesure de la locomotion totale plus précise que celle du nombre total d'entrées dans les bras (**Dawson et al., 1995 ; Weiss et al., 1998**),

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

II.2.5.3. Procédure des champs ouverts (Open Field Test)

a. Description du test

Le test de l'Open field, initialement décrit par **Hall (1934, 1938)**, a été développé dans le but de mesurer les différences de réactivité émotionnelle chez le rat. Brièvement, le test consiste à placer l'animal dans une enceinte inconnue (Hall emploie les termes de *strange* ou *unfamiliar*) puis à observer son comportement et l'évolution de ce comportement au cours de plusieurs sessions d'exposition. Parmi les premières mesures reflétant la réactivité émotionnelle, **Hall (1934)** propose tout d'abord la fréquence des défécations et mictions au cours des différentes sessions. En effet, l'activation du système nerveux végétatif de l'animal conduit au déclenchement de ces réactions et Hall trouve de fortes corrélations négatives entre ces occurrences et le fait de s'alimenter dans la situation de test, ce dernier comportement reflétant pour Hall une faible réactivité émotionnelle. Dans une seconde étude, **Hall (1938)** propose l'activité ambulatoire (*ambulatory activity*), en distance parcourue par unité de temps, comme mesure de la réactivité émotionnelle. Sur la base des travaux de Hall, et compte tenu de son aspect pratique, l'Open field a été très largement utilisé pour aborder la réactivité émotionnelle chez les rongeurs. Les mesures de Hall ont été appuyées par certains auteurs (**Denenberg, 1969**). et critiquées par d'autres (**Walsh et Cummins, 1976**). Les mesures de défécations et de mictions ont été très souvent critiquées, notamment parce qu'elles sont difficilement utilisables en pharmacologie (**Boissier et Simon,**

1965). De plus, l'utilisation d'un indice de locomotion comme indice de réactivité émotionnelle semble problématique, surtout au cours de la première session de test. En effet, des animaux peuvent montrer une locomotion élevée dans le but d'explorer le dispositif, ce qui témoignerait d'une faible réactivité émotionnelle, mais aussi dans le but de chercher un moyen d'échapper au dispositif, ce qui témoignerait au contraire, d'une forte réactivité émotionnelle. Malgré ces problèmes d'interprétation des données, l'Open field test est toujours employé dans de nombreuses études comme test de mesure de la locomotion.

b. Dispositif utilisé

L'activité locomotrice, considérée comme un index d'anxiété des rats, est mesurée dans le test de l'Open Field, grâce à un dispositif fréquemment utilisé en expérimentation. Le dispositif utilisé est une enceinte carrée en plexiglas de 1 mètre de côté et de 50 cm de haut. Il est divisé en 2 parties de même superficie : 1 partie centrale et 1 partie périphérique. La partie centrale sert de point de départ aux animaux à chaque test (**Fig.3.C**).

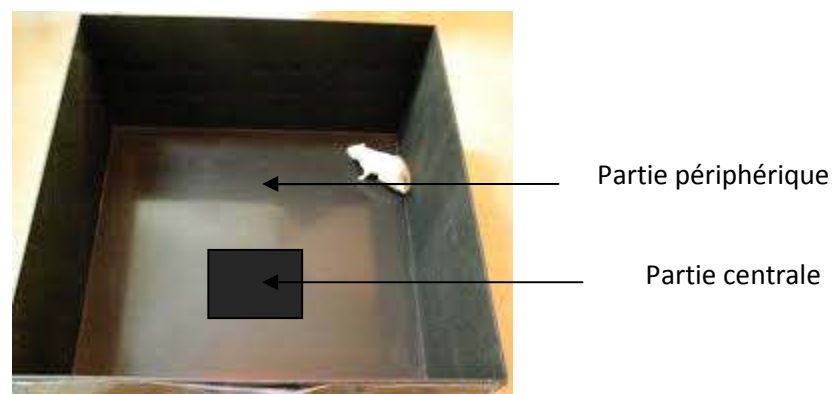


Figure 3. C. Dispositif utilisé dans l' OF

c. Variables mesurées

La locomotion dans l'Open field a été évaluée en relevant la distance totale parcourue, le nombre d'entrées dans la partie centrale, le temps d'immobilité et le nombre de redressement.

II.2.5.4. Procédure de Labyrinthe aquatique de Morris (Morris water Maze Test)

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

a. Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental du test de la piscine de Morris est constitué d'une enceinte circulaire métallique de 160 cm de diamètre et de 60 cm de hauteur, remplie à mi-hauteur d'eau 22 à 32 ° C. L'eau est rendue opaque par adjonction de lait en poudre. La plate-forme, constituée d'un cylindre (11cm de diamètre) en plastique transparent, est immergée à 1cm sous la surface afin d'être invisible pour l'animal. **(Fig 3.D).**

La piscine est placée dans une pièce comportant différents indices distaux (étagères avec cages, tuyaux peints, ventilation, formes géométriques, etc.) susceptibles de permettre à l'animal de se repérer dans l'enceinte et de

mémoriser la position de la plate-forme par rapport à un cadre de référence allocentrique. La tâche du rat est d'apprendre à rejoindre la plate-forme le plus directement possible. Le trajet effectué par l'animal est filmé à l'aide d'une caméra vidéo.

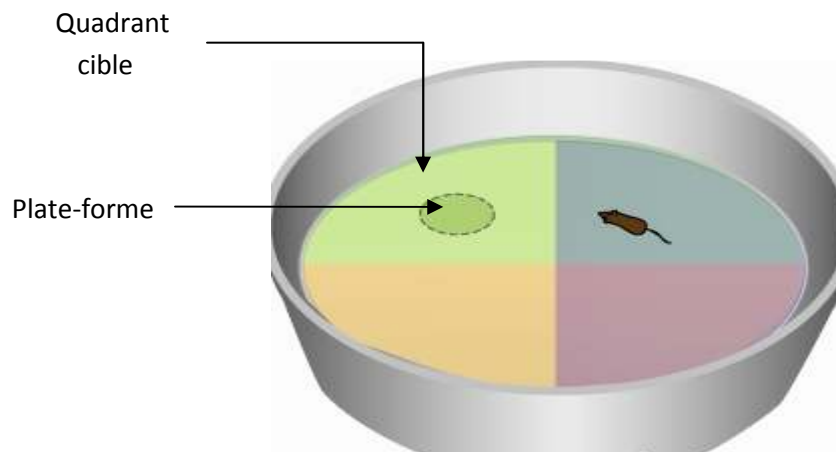


Figure 3. D. Dispositif utilisé dans MWM

b. Protocole et variables mesurés

Le test dure 4 jours, avec 5 sessions par jour pendant les 3 premiers jours. Le quatrième jour, les rats ont deux passages avec la plate-forme immergée et 3 passages réguliers sans plate-forme. Lors de chaque test, l'animal est placé dans l'eau à la périphérie dans des lieux différents et nage pour trouver la plate-forme. Il est ensuite sorti de l'eau. Les sessions sont enregistrées sur vidéo pendant 60 secondes et les paramètres suivants sont mesurés: le temps passé dans le quadrant cible, le temps de latence, le nombre d'entrées dans le quadrant cible et la distance parcourue dans le quadrant cible.

II.2.6. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont représentés sous forme de moyenne plus ou moins écart-type ($m \pm s$) et illustrés par des tableaux et figures. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un logiciel statistique MINITAB où nous avons sollicité le modèle linéaire généralisé pour faire une comparaison statistique globale des moyennes des échantillons (test ANOVA). Ce module nous donne automatiquement le résultat du test de comparaison des moyennes par rapport à la moyenne du contrôle (Test de Dunett).

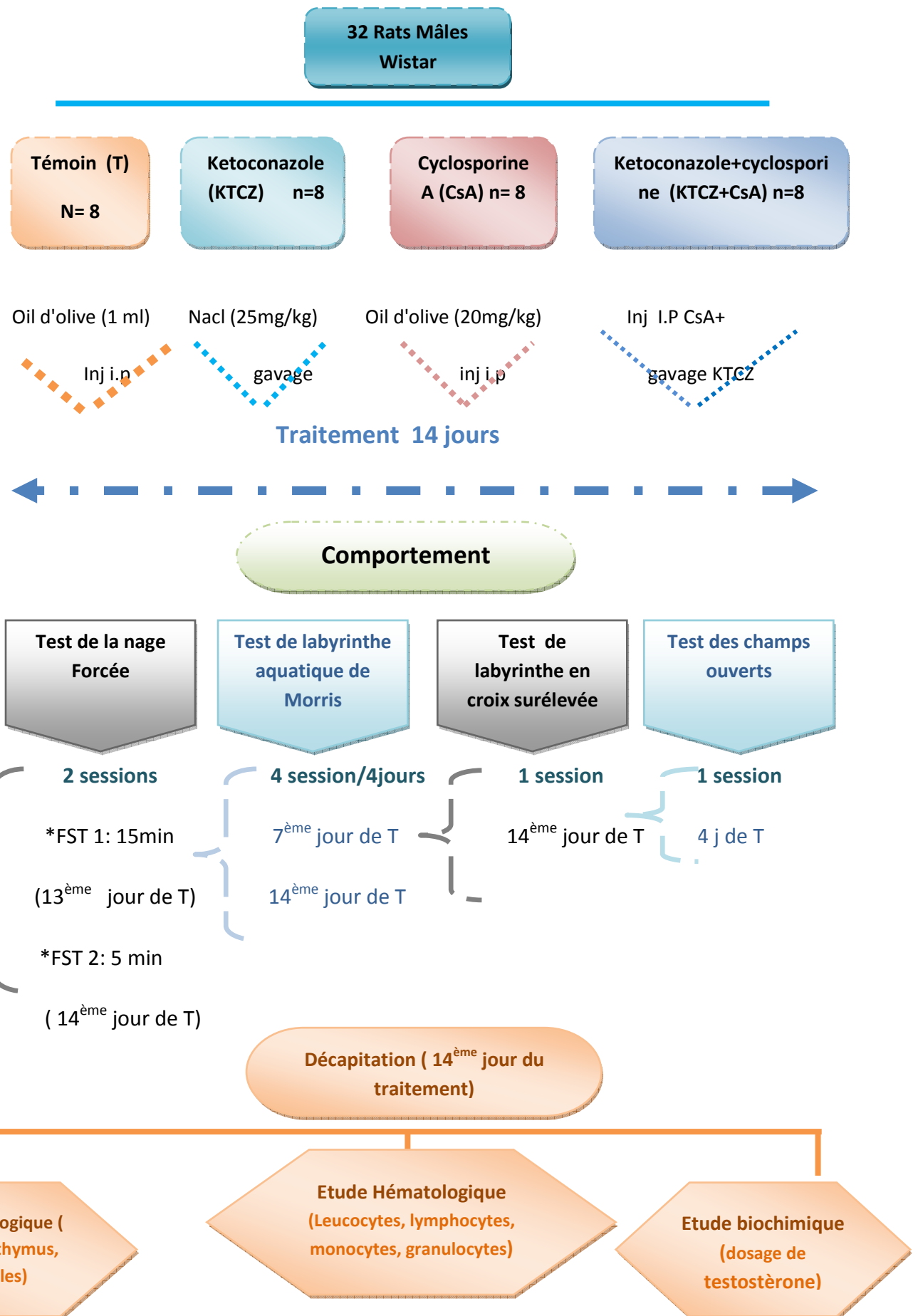


Figure 4: illustration schématique de l'expérimentation

III. RESULTATS

III.1. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres biologiques

III.1.1. Evaluation de l'état pondéral

Le suivi des paramètres métriques en l'occurrence, le poids corporel, le poids relatif du testicules, surrénales et thymus sont exprimés en gramme chez les quatre lots (T, KTCZ, CsA , KTCZ+CsA) et sont rassemblés dans le (Tab 02).

Tableau 02: Variation du poids corporel et poids relatif des organes chez les rats témoins et traités.

Paramètres / Lots	Témoin	KTCZ	CsA	KTCZ+CsA
Poids corporel (g)	250.13±10.00	242.75 ± 5.70 ns	228.69± 5.53 *	237.83±12.50 *
Testicules (g/100g)	1.26 ± 0.084	1.12 ± 0.072 *	1.20 ± 0.046 ns	1.18 ± 0.052 ns
Thymus (g/100g)	0.085 ± 0.017	0.132±0.054 ***	0.033±0.005 ***	0.056±0.005 ***
Surrénales (g/100g)	0.018± 0.001	0.045± 0.005 ***	0.032 ± 0.009 *	0.029±0.003 ***

N= 8. N.s: non significatif. * P ≤ 0.05 ; ** p ≤ 0.01 ; *** p ≤ 0.001 vs T.

L'estimation du poids corporel a montré une chute du poids des animaux traités. Cette diminution est plus marquée chez les rats traités à la CsA seule.

Le traitement combiné CsA+KTCZ apparemment engendre relativement un regain du poids.

Les testicules accusent une chute significative du poids chez les rats traités au KTCZ par rapport aux témoins (T : 1.26 vs KTCZ: 1.12), qui n'est pas significative chez les autres lots (CsA et CsA+KTCZ).

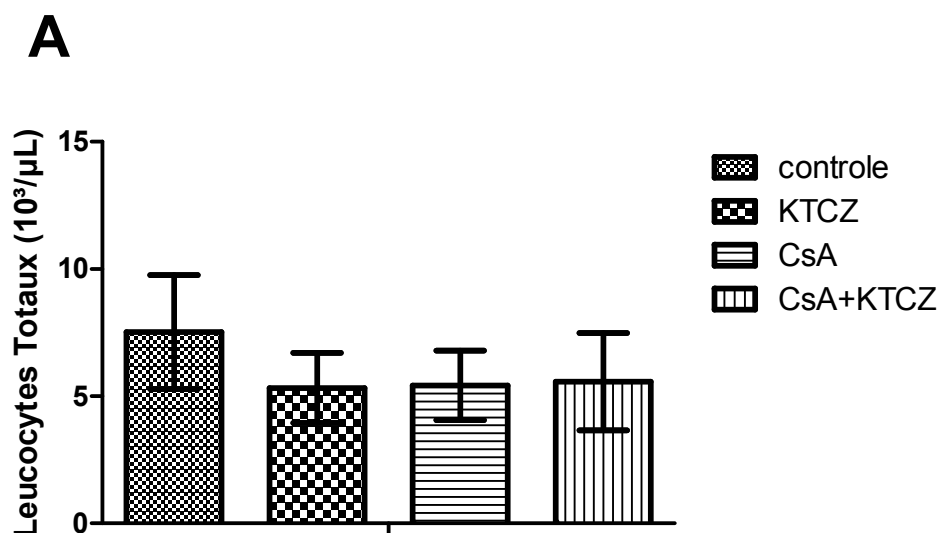
Le poids du thymus augmente chez les rats traités au KTCZ (KTCZ:0.132 vs T:0.085) ; à l'inverse le traitement à la CsA, le fait chuter (CsA: 0.033 vs T: :0.085).

Le poids des surrénales augmente chez tous les animaux traités comparativement aux témoins (KTCZ: 0.045; CsA: 0.032; KTCZ+CsA: 0.029 vs T: 0.018). Cette augmentation est plus importante chez les rats traités au KTCZ.

En somme, nous constatons que le traitement combiné (CsA+KTCZ) semble rétablir relativement le poids de chaque organe ou du moins évolue dans le sens de la réparation.

III.2. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres Hématologiques

Le suivi des paramètres hématologiques en l'occurrence, le nombre des leucocytes totaux et le pourcentage des lymphocytes, monocytes et des neutrophiles chez les rats témoins (T) et les rats traités aux KTCZ et CYS sont rassemblés dans le **(Figure 5)**.



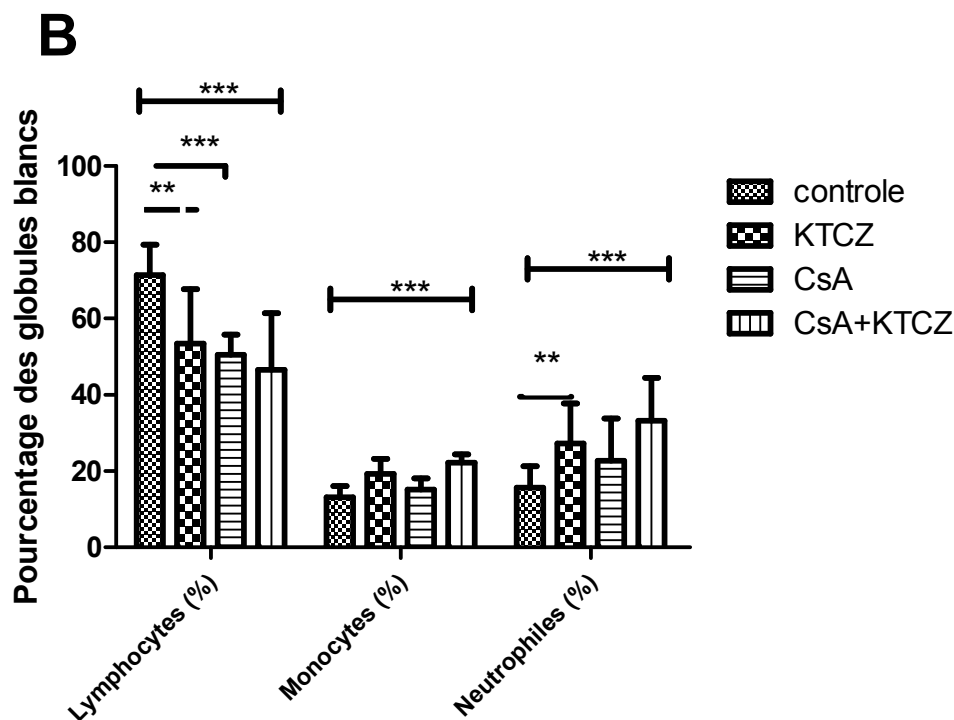


Figure 5. Variation des populations leucocytaires chez les rats contrôles et traités. **A.** Leucocytes totaux. **B.** pourcentages des globules blancs (Lymphocytes, Monocytes et Neutrophiles). (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

D'après nos résultats, les leucocytes totaux sont diminués de manière non significative chez les groupes témoin et traité par rapport au groupe témoin (KTCZ : 5.32 ; CsA : 5.42; KTCZ +CsA : 5.57 vs T : 7.52).

Par contre, une lymphopénie a été remarquée chez tous les groupes d'animaux traités par rapport au groupe contrôle (KTCZ : 53.47 ; CsA : 50.55; KTCZ + CsA : 46.55 vs T : 68.23).

En revanche, le taux des monocytes (KTCZ : 19.25 ; CsA : 15.15; KTCZ+CsA : 22.18 vs T : 15.38) et des neutrophiles (KTCZ : 27.27 ; CsA : 22.74; KTCZ+CsA : 33.17 vs T : 16.35) ont augmenté significativement chez les rats traités comparativement aux témoins.

III.3. Effets de la CsA et KTCZ sur les paramètres Biochimiques

III.3.1. Variation de niveau de la testostérone plasmatique (ng/ml) chez les rats témoins et traités.

Nos résultats montrent que la testostérone a diminué significativement dans les groupes traités par le KTCZ et CsA, par rapport au groupe contrôle (T: 4,2567 vs KTCZ: 0,095, CsA: 0,656). Par contre cette chute est rétablie chez le groupe ayant reçu un traitement combiné (KTCZ + CsA: 3,255).

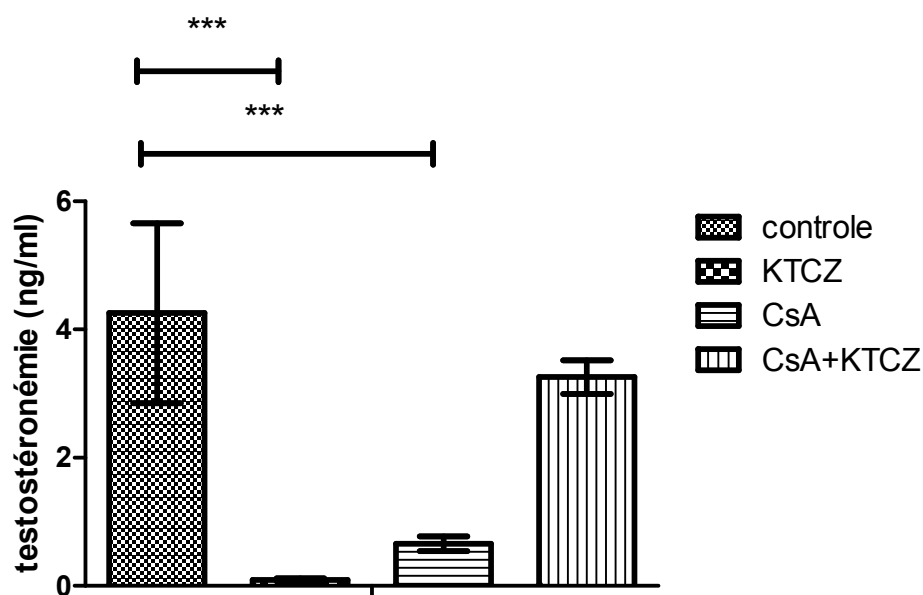


Figure 6: Variation de la testostéronémie chez les rats contrôles et traités. (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

III.4. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des organes

Dans le but de vérifier l'effet du ketoconazole et la cyclosporine A sur l'architecture tissulaire des organes, nous avons réalisé des coupes histologiques au niveau des testicules, thymus et surrénales chez les rats mâles Wistar témoins et traités.

III.4.1. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des testicules

Les coupes histologiques réalisées sur les animaux témoins montrent une architecture normale. La paroi des tubes séminifères est formée d'épithélium stratifié comprenant deux types de cellules: les cellules de la lignée germinale disposées sur 4 à 8 couches et les cellules de Sertoli, cellules hautes

s'appuyant sur la membrane basale et atteignant la lumière du tube par leur pôle apical. Les cellules germinales sont, dans l'ordre, de la périphérie vers la lumière du tube séminifère, les spermatogonies, les spermatocytes I, les spermatocytes II, les spermatides et les spermatozoïdes (**Fig 7. A**).

Par contre, l'observation microscopique des testicules des rats traités par la CsA montre une dégénérescence testiculaire modérée et une nécrose des cellules germinales (*), représentés par l'absence de trainées spermatique et nous observons aussi un début d'atrophie du tissu conjonctif car l'espace interstitiel est visible (▲) (**Fig 7.B**).

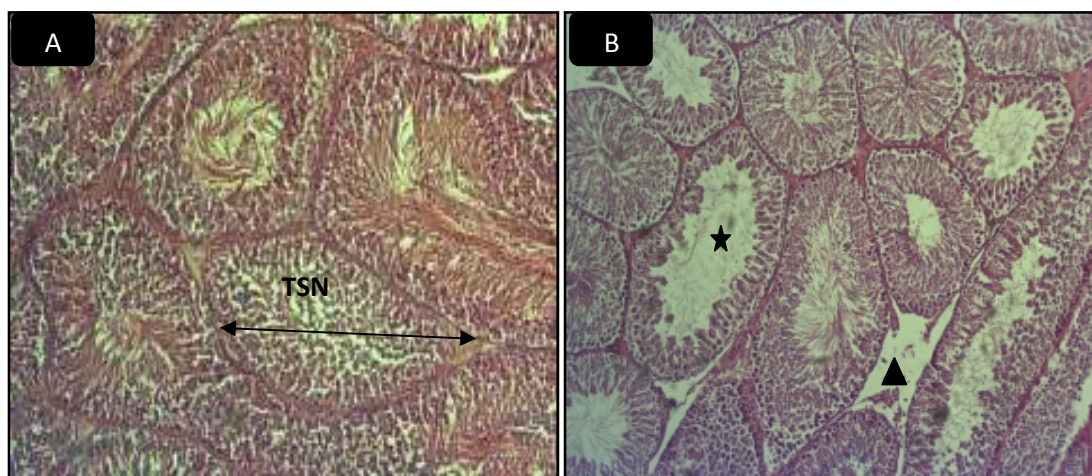


Figure 7: Observation au microscope optique des coupes histologiques des testicules des rat témoin (A) et de rat traité au CsA (B). (Coloration à H & E, Gr x10).

De plus, l'analyse les coupes histologiques des rats traités par une forte dose du KTCZ montre des altérations importantes: une nécrose des cellules germinales (*), une atrophie tubulaire, vacuolisation des cellules de Sertoli (petites flèches), nécrose et désintégration des spermatocytes dans la membrane basale (▲) et la désorganisation de l'épithélium germinal (**Fig 8.A**). Cependant, nous notons l'atténuation des lésions testiculaires des rats co-traités par le KTCZ + CsA avec des tubes séminifère normales. (**Fig 8.B**).

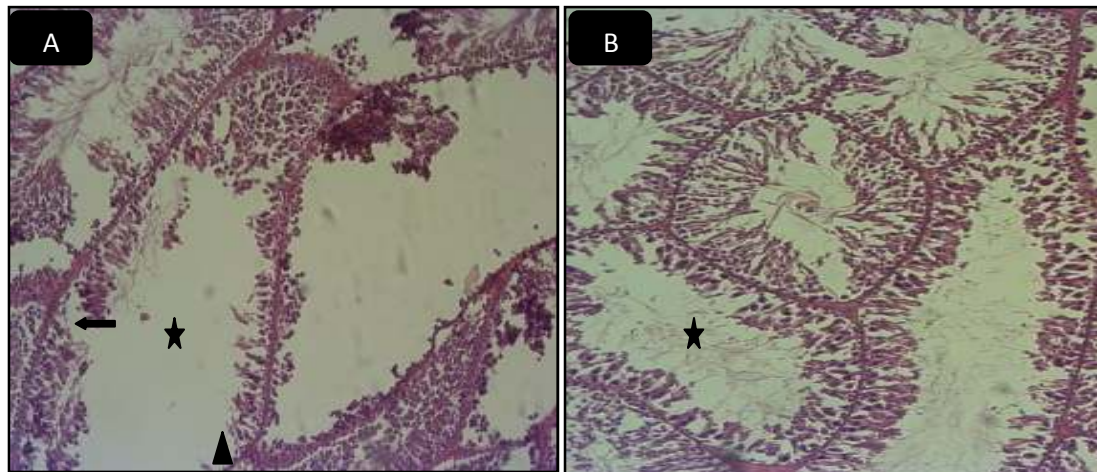


Figure 8: Observation au microscope optique des coupes histologiques des testicules de rat traité par la KTCZ (A) et de rat traité par CsA+KTCZ (B). (Coloration à H & E, Gr x10).

III.4.2. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique du thymus

L'observation microscopique réalisé sur coloration topographique des coupes histologique révèle un aspect histologique et un taille normale des lobules du thymus chez le rat témoin (**Fig 9.A**). Par contre, l'analyse microscopique des coupes histologique du thymus de rat traité par CsA (C) montre une dégénérescence lobulaire (*) (**Fig 9. B**);

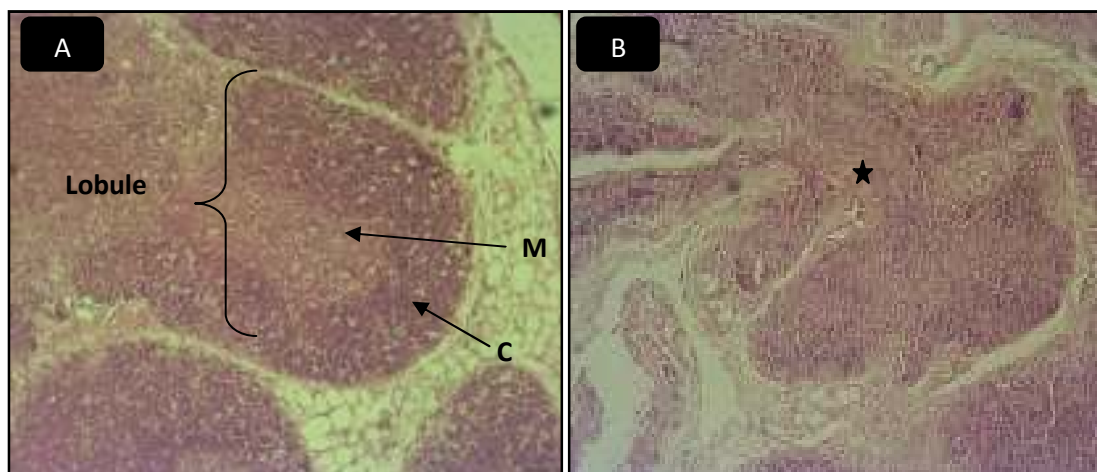


Figure 9: Observation au microscope optique des coupes histologiques du thymus chez le rat témoin (A) et chez le rat traité au CsA (B) (Coloration à H & E, Gr x10).

Cependant, le thymus de rat traité par KTCZ montre une hypertrophie lobulaire (▲) révélé par l'augmentation de la taille du lobule dans le même grossissement microscopique (**Fig 10.A**). De plus, le thymus de rat traité par KTCZ + CsA montre une régénération discrète des lobules et l'apparition du zone médullaire et corticale (**Fig 10.B**).

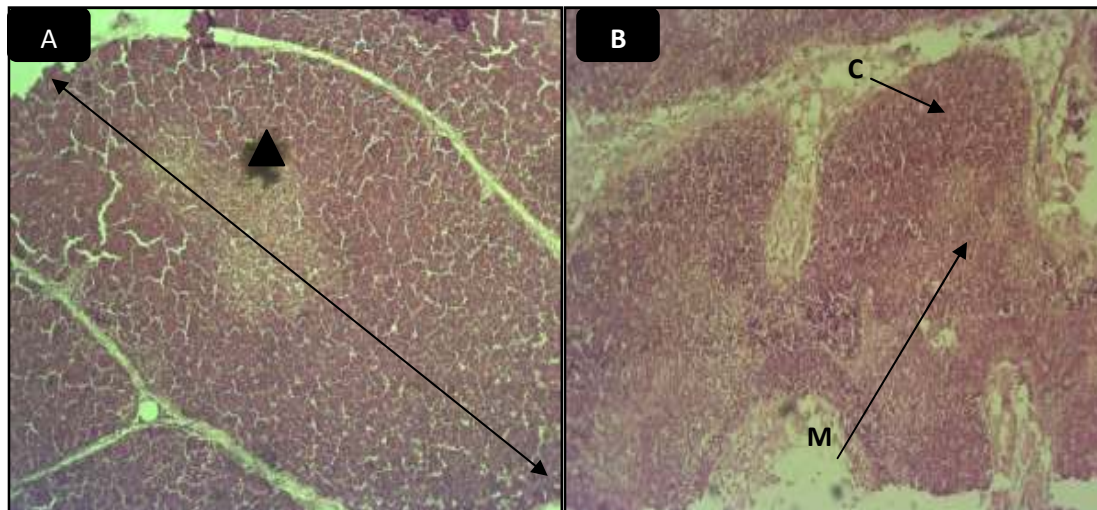


Figure 10: Observation au microscope optique des coupes histologiques du thymus chez le rat traité au KTCZ (A) et chez le rat traité au KTCZ+CsA (B) (Coloration à H & E, Gr x10).

III.4.3. Effet du KTCZ et CsA sur la structure histologique des surrénales

La **Fig 11. A** montre une vue générale des surrénales d'un rat témoin, on distingue la zone médullaire, la zone corticale et la capsule. Par contre le traitement de rat par la CsA provoque une hyperplasie de la zone corticale (HC) de la glande surrénale (**Fig 11.B**).

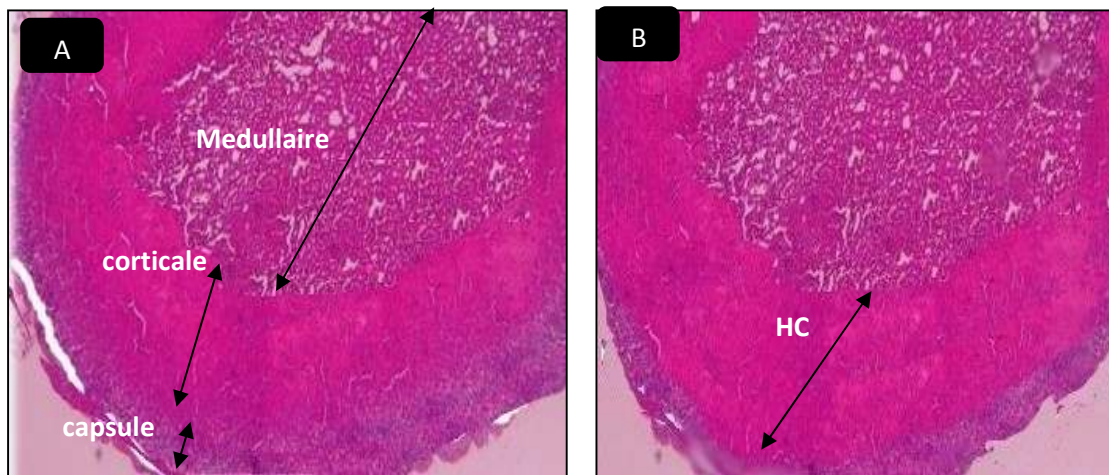


Figure 11: Observation au microscope optique des coupes histologiques des surrénales chez le rat témoin (A) et traité au CsA (B) (Coloration à H & E, Gr x10)

Cependant, notre coupe histologique montre une hyperplasie médullaire (HM) chez le rat traité par le KTCZ (**Fig. 12. A**), alors que celle traités par le KTCZ + CsA (**Fig 12.B.**) montre une hyperplasie discrète de la zone médullaire .

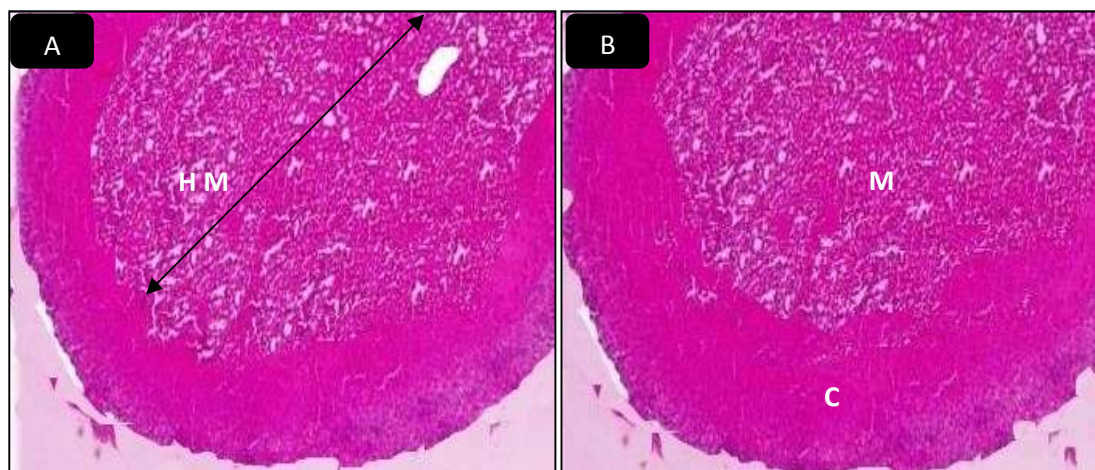


Figure 12: Observation au microscope optique des coupes histologiques des surrénales chez le rat traité au KTCZ (A) et rat traité au KTCZ+CsA (B) (Coloration à H & E, Gr x10).

III. 5. Effet de la CsA et KTCZ sur le comportement

III.5.1. Effets du kétoconazole et de la cyclosporine A sur la capacité mémorative au cours du teste de labyrinthe de Morris

La **Fig 13** rapporte le suivi des paramètres du test de labyrinthe de Morris, Plus précisément, le temps de latence et de la distance parcourue, le nombre d'entrées et le temps passé dans le quadrant cible pour les quatre groupes des animaux.

L'analyse des données comportementales confirme l'existence d'un déficit de la mémoire de références chez les rats traités par KTCZ par rapport aux témoins, le traitement engendre une perturbation de l'acquisition aux 7^{ème} et 14^{ème} jour du traitement.

Chez les groupes traités aux CsA et CsA+KTCZ, nous avons noté une amélioration des capacités mémoratives qui se manifestent par une augmentation de la distance parcourue dans le quadrant cible (Fig 13, D) et réduction du temps de latence (Fig13, C).

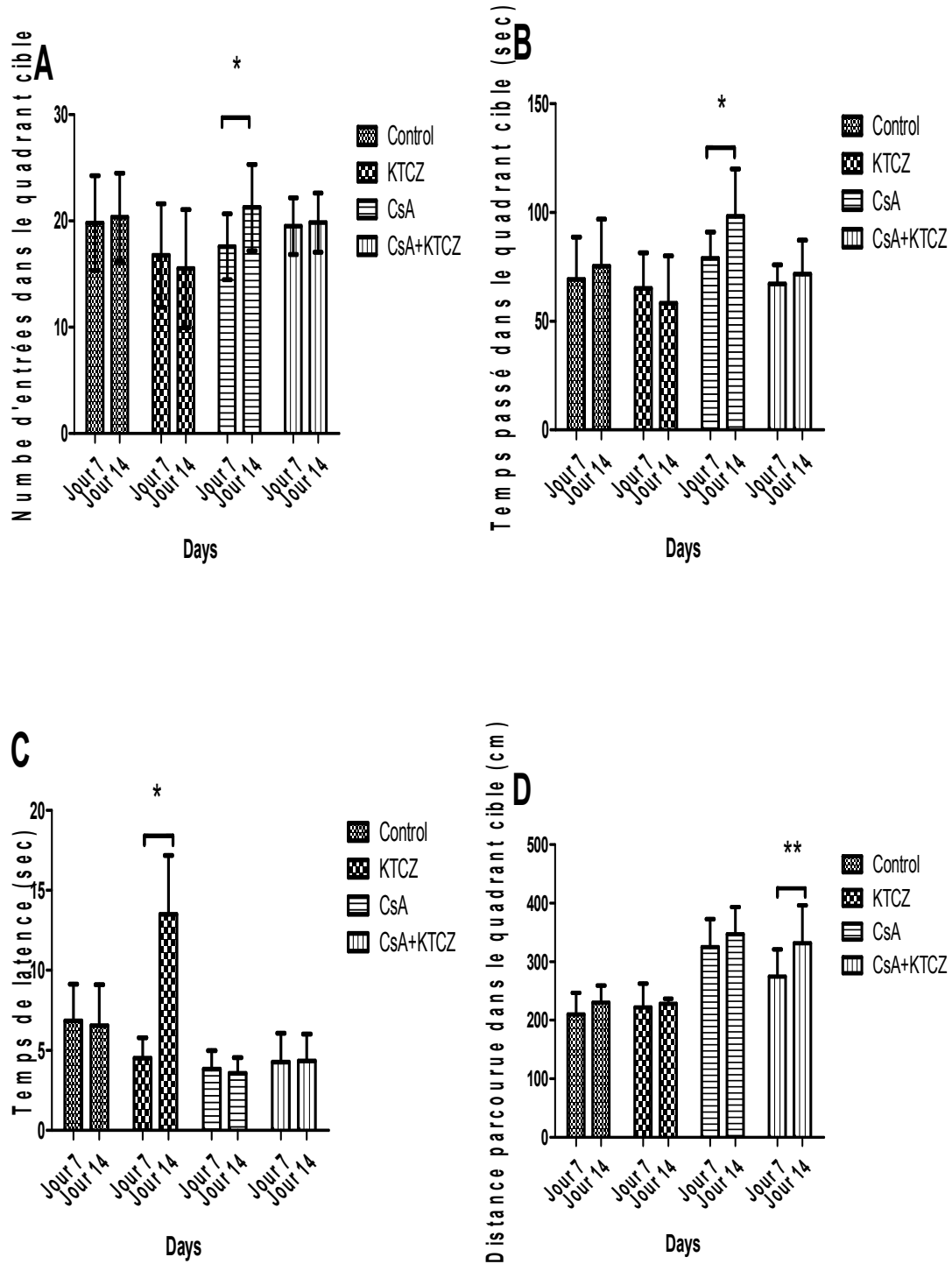


Figure 13: Variation des paramètres de labyrinthe de Morris aux 7^{ème} et 14^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités. (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

III.5.2. Effet de KTCZ et CsA sur le degré d'anxiété au cours du test de labyrinthe en croix surélevé

Le **Tab 03** représente les variations des paramètres de labyrinthe en croix surélevé au 14^{ème} jour de traitement chez les rats contrôles et traités.

On observe que tous les animaux traités (CsA, KTCZ, CsA+KTCZ) passent plus de temps dans les bras ouverts du dispositif (KTCZ: 201.20 ; CsA: 127.33; KTCZ + CsA: 204.83 vs T: 38.59) et y pénètrent le plus souvent (nombre d'entrées) (KTCZ: 4.400; CsA: 3.333 ; KTCZ + CsA: 3.333 vs T: 2.091) par rapport aux animaux contrôles. Ces animaux traités passent également plus de temps dans les parties distales des bras ouverts (KTCZ: 149.40; CsA: 75.00; KTCZ + CsA: 126.0 vs T: 15.73) et au centre du dispositif (KTCZ : 53.80 vs T : 8.41). Par contre, les animaux contrôles passent plus de temps dans les bras fermés du labyrinthe (KTCZ : 47.20 vs T : 252.09).

La locomotion des animaux traités n'a pas été affectée. Ceci est observable par le nombre total d'entrées dans les bras (KTCZ: 5.800, CsA: 5.333; KTCZ + CsA: 4.667 vs T: 5.955). Cependant, les animaux traités au KTCZ+CsA effectuent moins de redressements comparativement au contrôles. (KTCZ+CsA: 2.167 vs T : 8.00).

Tableau 03: Variation des paramètres de test de labyrinthe en croix surélevé chez les rats Témoins et traités.

Comportement/ Lots	Témoin	KTCZ	CsA	KTCZ+CsA
Temps passé au centre (sec)	8.41 ± 5.51	53.80 ± 30.95 ***	9.33 ± 3.61 ns	24.33 ± 16.56***
Temps passé dans les bras ouverts (sec)	38.59 ± 8.01	201.20 ± 67.98 ***	127.33 ± 54.25***	204.83 ± 36.70 ***
Temps passé dans la partie distal des bras ouverts (sec)	15.73 ± 18.23	149.40 ± 78.79 ***	75.00 ± 67.60***	126.0 ± 67.00***
Temps passé dans les bras fermés (sec)	252.09 ± 32.02	47.20 ± 37.59 ***	163.33 ± 55.64 ***	70.83 ± 43.08 ***
Temps passé dans la partie distal des bras fermés (sec)	228.86 ± 43.83	35.40 ± 29.07 ***	92.17 ± 54.18 ***	57.83 ± 35.40 ***
Nombre d'entrées dans les bras fermés	3.818 ± 2.481	1.400 ± 0.548**	2.000 ± 0.894 **	1.333 ± 0.516**
Nombre d'entrées dans les bras ouverts	2.091 ± 1.065	4.400 ± 0.548 ***	3.333 ± 1.033	3.333 ± 1.211
Nombre totale d'entrées dans les bras	5.955 ± 3.457	5.800 ± 0.447 ns	5.333 ± 1.751 ns	4.667 ± 1.506 ns
Nombre de redressements	8.00 ± 4.536	5.200 ± 1.789 ns	5.667 ± 1.862 ns	2.167 ± 1.472**

n=8 ; n.s: non significatif * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

III.5.3. Effets du traitement aux KTCZ et CsA sur l'état dépressif au cours de test la nage forcée (FST).

La **Fig 14** représente la variation des temps d'immobilité , temps de la nage et temps d'escalade chez les rats témoins et traités subissent le teste de la nage forcée au 14^{ème} jour de traitement.

Dans nos résultats , nous avons remarqué que les rats témoins étaient immobiles pour plus de 60% du temps au cours du deuxième jour de l'essai indiquant que dans notre conditions expérimentales la FST a été bien contrôlée. Le temps d'immobilité chez les rats traités aux KTCZ, CsA et CsA +KTCZ est plus court par rapport les rats témoins. Ceci dénote un effet antidépresseur de ces drogues.

En outre, nous avons constaté que le temps de nage mesuré chez les animaux traités aux CsA et CsA+KTCZ est prédominant. En revanche, chez les animaux traités au KTCZ seul, c'est plutôt le temps d'escalade qui est augmenté. Autrement dit, le KTCZ fait diminuer le temps d'immobilité en faisant augmenter le temps de d'escalade. Par contre, la CsA et la CsA+KTCZ font réduire le temps d'immobilité en faveur d'une augmentation du temps de la nage.

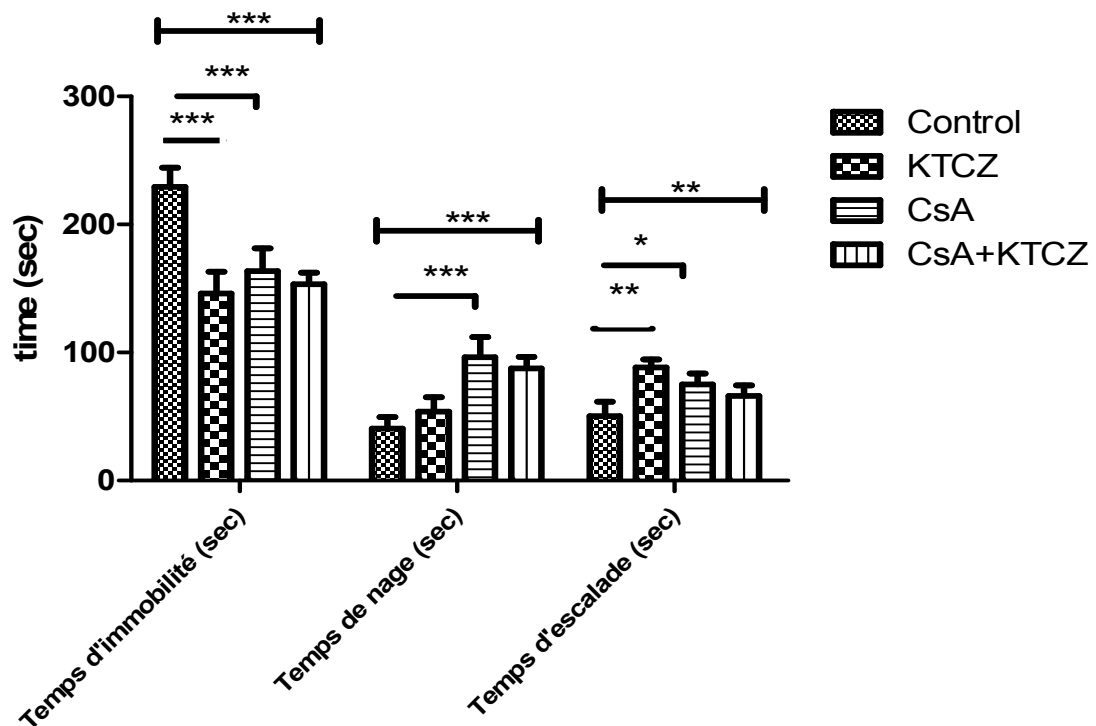


Figure 14 : Effets du KTCZ et de la CsA sur les paramètres de la nage forcée chez le rats mâles Wistar (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

III.5.4. Effet des KTCZ et CsA sur l'activité locomotrice au cours du test des champs ouverts.

L'évaluation de l'activité locomotrice des rats témoins et traités au niveau de l'Open field est représenté dans la figure 15.

L'analyse de nos résultats montre que l'activité locomotrice a été diminué significativement chez tous les groupes traités comparativement aux témoins, ce se traduit par le décroissement de la distance totale parcourue, (KTCZ : 905.0 ; CsA ; 568.6 ; KTCZ+CsA : 548.9 vs T : 1083.2), l'accroissement de nombre de redressement (KTCZ : 6.750 ; CsA : 3.143 ; KTCZ+CsA : 7.333 vs T : 8.393) et l'augmentation du temps d'immobilité (KTCZ : 132.25; CsA : 201.14 ; KTCZ+CsA : 196.11 vs T : 130.71) .

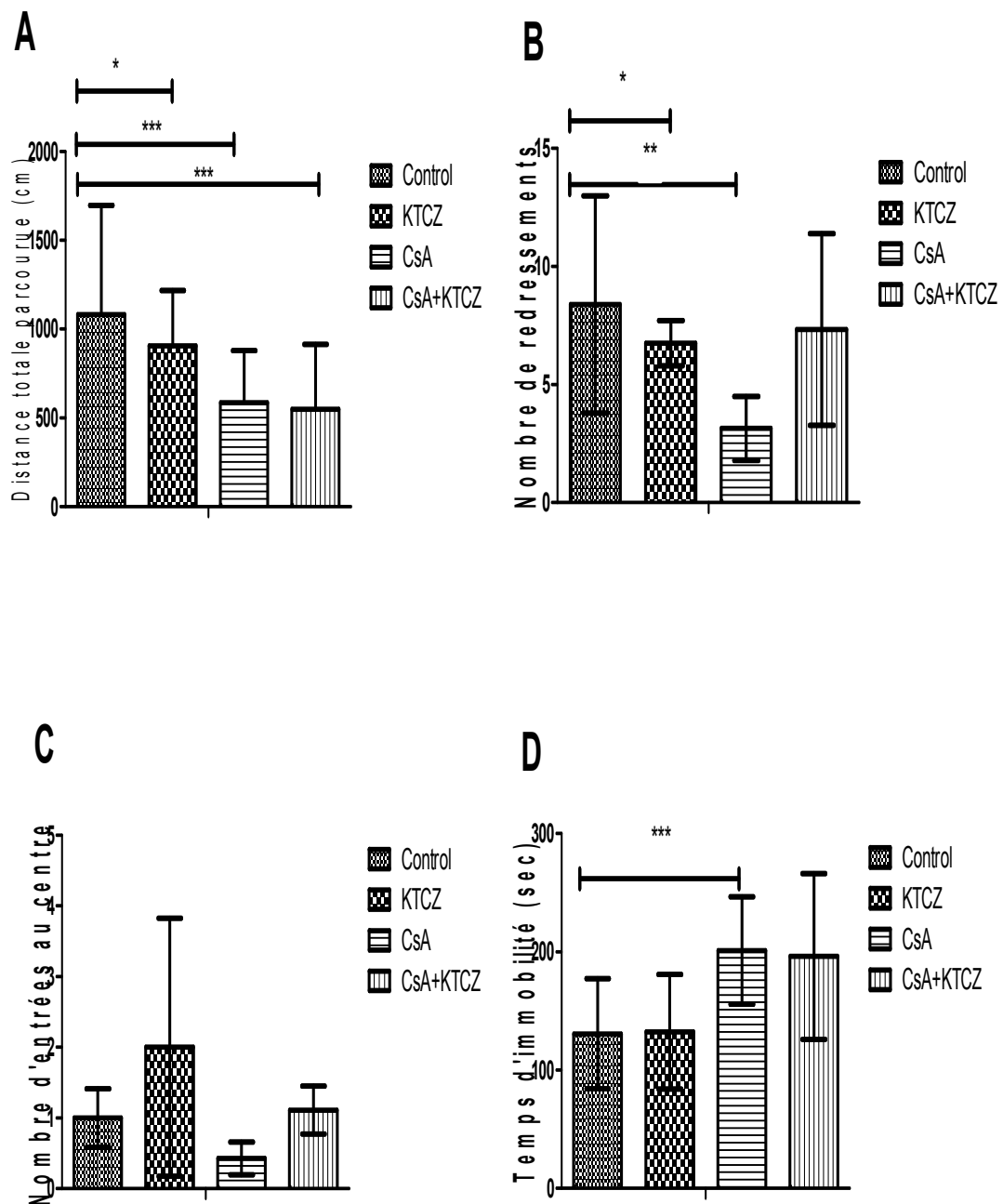


Figure 15. Variation des paramètres de test des champs ouverts chez les rats témoins et traités. **A.** Distance totale parcourue (cm); **B.** Nombre de redressements; **C.** Nombre d'entrées au centre; **D.** Temps d'immobilité (* $P \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

IV. DISCUSSION

Dans la présente étude, l'administration de la CsA seule a entraîné une diminution non significative du poids des testicules associée à une dégénérescence testiculaire (Fig 7.B) et un déclin de la testostéronémie (Fig. 6). A ce titre, il a été rapporté que l'administration de CsA, dose dépendante (20mg/kg ou plus), provoque une diminution du poids des organes reproducteurs des rats mâles non transplantés (**Seethalakshmi et al., 1987 ; Seethalakshmi et al., 1990b**). Le traitement à la CsA de patients transplantés peut conduire à des anomalies de la fonction gonadique (**Handelsman et al., 1984**). Ce dysfonctionnement de la fonction gonadique peut être expliqué par l'effet direct de la CsA sur les testicules ou indirect médié par d'autres facteurs, voire d'autres voies (facteurs du stress oxydatif, facteurs neuro-endocriniens, facteurs neuro-immunitaires, etc.).

Il a été signalé que l'augmentation des niveaux de ROS (reactive oxygen species) induite par la CsA conduit à une diminution de la production de testostérone (**Sikka et al., 1988**) et de la proportion volumique de cellules de Leydig (**Monteiro et al., 2008**). Les spermatozoïdes sont particulièrement sensibles aux dommages induit par un excès de ROS (**Aitken et McLaughlin, 2007; Agarwal et al., 2008**). Les ROS peuvent attaquer les liaisons insaturées des lipides de la membrane. Ainsi, l'augmentation de radicaux libres dans les cellules peut induire la peroxydation lipidique par décomposition oxydante d'acides gras polyinsaturés dans les membranes des cellules. De toute évidence, la peroxydation des lipides du sperme détruit la structure de la matrice lipidique des membranes des spermatozoïdes, et elle est associée à une perte rapide de l'ATP intracellulaire menant à une diminution de la viabilité des spermatozoïdes et une inhibition de la spermatogenèse dans les cas extrêmes (**Misro et al., 1999; Türk et al., 2007**). **Xu et al. (2003)** ont rapporté que des doses différentes de CsA affectent la morphologie des spermatozoïdes de l'homme après une transplantation rénale. **Misro et al. (1999)**, ont montré que 15 mg/kg de CsA provoque une réduction de la concentration des spermatozoïdes épидидymaires chez les rats sains non-transplantés. La CsA entraîne une dégénérescence de l'épithélium séminifère, nécrose, œdème interstitiel, ainsi

qu'une desquamation des cellules germinales (**Sirinivas et al., 1998; Misro et al., 1999; Monteiro et al., 2008**).

Chez les rats mâles, la CsA pourrait inhiber ou stimuler les taux de LH plasmatiques, en fonction des niveaux de testostérone périphérique (**Sikka et al., 1988**). L'administration de CsA a pour effet d'augmenter les taux de prolactine sérique, d'inhiber sélectivement les récepteurs de la prolactine (**Stephan et al., 1984**) et d'induire une légère hyperglycémie indépendante des niveaux d'insuline (**Kahan, 1989**). Le traitement à la CsA de rats mâles se traduit également par une diminution réversible, dépendante de la dose, des niveaux de testostérone intratesticulaire et de la LH sérique (**Rajfer et al., 1987; Sikka et al., 1988b**). Ces résultats indiquent que chez des modèles animaux, la CsA pourrait agir au niveau central et que la dose utilisée paraît déterminante.

Les premiers travaux sur les effets neuroendocriniens de la CsA ont suggéré que cet immunosuppresseur peut influencer la fonction corticosurrénale par une augmentation de la sécrétion de l'hormone corticotrope hypophysaire (ACTH) (**White, 1982**). Cependant, d'autres rapports ont indiqué que la CsA exerce plutôt un effet inhibiteur sur l'axe hypothalamo-hypophysaire (**Sikka et al., 1988a**), et peut freiner la croissance et l'activité des cellules stéroïdogènes corticosurrénales du rat (**Rebuffat et al., 1989**).

Dans notre étude, la CsA a provoqué une augmentation significative du poids des surrénales (Tab 02) associée à une hyperplasie de la zone corticale (Fig 11.B). En revanche, le traitement des animaux au KTCZ a entraîné une hyperplasie de la zone médullaire (Fig12.A) avec augmentation très significative du poids des surrénales. Au niveau du thymus, la CsA a entraîné une diminution très significative du poids associée à une dégénérescence du tissu thymique (Fig 9.B) , par contre le KTCZ a provoqué l'effet contraire, une augmentation du poids du thymus associée à une hypertrophie lobulaire (Fig 10.A). Le seul effet similaire enregistré se situe au niveau testiculaire où nous avons enregistré une diminution du poids des testicules et une dégénérescence des tubes séminifères (Tab 02).

Soulignons que d'après les données bibliographiques disponibles, le KTCZ est un cortico-bloquant qui agit à la fois sur la stéroïdogénèse corticosurrénalienne et gonadique, alors que la CsA agit seulement sur les testicules. Ceci laisse à penser que ces variations pondérales et histologiques pourraient avoir plusieurs origines où les glucocorticoïdes jouent un rôle important. En effet, excepté les érythrocytes, la plupart des cellules possèdent des récepteurs aux glucocorticoïdes. Par conséquent, les effets physiologiques et pharmacologiques de cette hormone sont très variables. Les glucocorticoïdes sont connus pour avoir des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs distincts. L'immunosuppression des glucocorticoïdes est médiée par un effet cytolytique direct, par l'inhibition de la fonction du lymphocyte, ou indirectement par le biais des médiateurs suppresseurs solubles (**Munck et al., 1987**). L'administration des glucocorticoïdes in vivo a pour conséquence l'involution thymique prononcée, et l'analyse immunohistologique a montré une apoptose étendue au niveau du cortex thymique (**Ishiyama et al., 1998**). Ceci suggère que la CsA aurait entraîné, comme nous l'avons souligné plus haut, une augmentation de la sécrétion d'ACTH hypophysaire qui est à l'origine de la dégénérescence thymique observée. Un autre argument en faveur de l'activation de l'axe corticotrope est l'hyperplasie de la zone corticale.

En outre, il a été démontré que l'adrénalectomie chez les souris mène à une croissance pondérale significative du thymus et de la rate et une augmentation du nombre de lymphocytes T spléniques (**Hirokawa et al., 1982**). Cet effet est dû, d'une part, à une diminution des taux sériques de glucocorticoïdes, et d'autre part, à une augmentation des taux sériques de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). Dans nos résultats, l'hypertrophie thymique a été associée à une réduction de l'épaisseur du cortex surrénalien. En retour, le thymus peut également influencer la fonction surrénalienne. Il a été observé que l'implantation du thymus d'un nouveau-né a fait augmenter le poids des surrénales chez les souris (**Hirokawa et al., 1982**). Cette augmentation de poids est probablement médiée par la sécrétion d'ACTH lymphocytaire (**Kruger et al., 1989**).

Ces effets bi-directionnels entre thymus et surrénales ont été clairement constatés dans notre étude, à travers l'estimation du poids de ces organes et l'observation des coupes histologiques, ainsi qu'à travers le traitement combiné (CsA+KTCZ) où nous avons constaté que ce traitement a entraîné une atténuation des lésions testiculaires, avec reprise de la fonction gonadique (illustrée par une testostéronémie normale), une régénération des lobules thymiques, une légère hyperplasie de la zone médullaire. Ceci dénote clairement d'un effet réparateur du KTCZ à l'égard de la toxicité causée suite à l'administration de la CsA et vis versa.

L'axe corticotrope joue un rôle important dans la communication entre les lymphocytes et le système neuroendocrine. Les lymphocytes peuvent influencer le fonctionnement de l'axe corticotrope par des cytokines, tels que TNF- α , IL-6, et interférons. Ces cytokines induisent la sécrétion du CRH dans l'hypothalamus, qui active à son tour l'axe corticotrope. On a démontré in vitro qu'IL-2 et IL-6 provoquent la prolifération des cellules de l'hypophyse antérieure, aussi bien que la sécrétion de GH, de PRL et d'ACTH (**Arzt et al., 1993; Karanth et al., 1993**).

En outre, des stéroïdes sexuels sont connus par leurs effets supresseurs sur les fonctions immunitaires (**Grossman, 1985**). Il a été également rapporté que les divers stéroïdes suppriment, chez la souris, la prolifération in vitro des cellules de rate en réponse à des mitogènes (**Hirokawa et al., 1979**). L'involution thymique physiologique qui commence aux alentours de la puberté peut être attribuée aux niveaux élevés des stéroïdes sexuels. Cependant, cette involution thymique n'est pas un phénomène irréversible. Chez les souris et les rats, l'atrophie du thymus à n'importe quel âge peut être renversée, et le thymus peut regagner sa taille après gonadectomie (testiculaire ou ovarienne) (**Brunelli et al., 1991; Utsuyama et al., 1995**).

Cette tendance a été retrouvée dans notre étude où nous avons enregistré une régression du poids des testicules et d'une diminution de la testostéronémie chez les animaux traités au KTCZ et cet hypogonadisme est accompagné d'une augmentation du poids du thymus et des surrénales. La diminution du poids des testicules pourrait être le reflet, soit de l'inhibition directe par le KTCZ ou médié par l'axe corticotrope. Une étude menée par

Lambert et al. (1986) a démontré que le KTCZ est plutôt plus efficace (comme inhibiteur in vitro et in vivo de la stéroïdogénèse) sur les testicules que sur les surrénales, mais l'inhibition est complètement réversible dans les deux types de cellules.

La restauration de la taille thymique après une gonadectomie est provisoire et est observée pendant plusieurs semaines. Cette restauration thymique peut être expliquée par une diminution de l'effet suppressif des stéroïdes sexuels sur les lymphocytes (**Greenstein et al., 1986**). Par ailleurs, l'hyperplasie thymique est plutôt tributaire de l'altération du rétrocontrôle négatif des stéroïdes sexuels sur l'axe hypothalamo-hypophysaire et l'hyperstimulation des hormones hypothalamiques qui jouent un rôle trophique sur le thymus. Ce concept a été soutenu par le fait que l'hyperplasie thymique après gonadectomie ne se produit pas chez les rats hypophysectomisés (**Utsuyama et Hirokawa, 1989**).

Dans une étude menée par **Gennady et al. (2004)**, chez le rat Wistar mâle, il a été démontré que le traitement chronique par une forte dose de KTCZ (25mg/Kg) a provoqué une augmentation significative du poids du thymus et des surrénales, la teneur en CRH est forte au niveau de plusieurs structures cérébrales (amygdale, éminence médiane, noyau paraventriculaire et noyaux du Raphé, etc.) et l'ACTH plasmatique a sensiblement augmenté. Ces résultats ont été également obtenus chez l'homme où il a été constaté que l'administration chronique de KTCZ a engendré une élévation très importante d'ACTH plasmatique (**Deuschle et al., 2003**). L'inhibition de la corticostérone plasmatique par le KTCZ a pu avoir pour conséquence l'activation rapide des mécanismes de rétroaction au niveau pituitaire et a provoqué la décharge d'ACTH observée. Cette sécrétion accrue d'ACTH tend à compenser l'inhibition de la synthèse de corticostérone (**Deuschle et al., 2003**) (qui a eu lieu sous l'effet du KTCZ) afin de maintenir l'homéostasie, en agissant sur les surrénales et en provoquant, de ce fait, l'hyperplasie surrénalienne. De plus, **Lambert et al. (1986)**, ont démontré que l'administration du KTCZ diminue la réponse du cortisol à la stimulation par l'ACTH au niveau surrénalien et de la testostérone à la LH au niveau testiculaire.

En outre, l'axe gonadotrope est inhibé à tous les niveaux par divers composants de l'axe corticotrope (**MacAdams et al., 1986; Rabin et al., 1988; Rivier et al., 1986**). Au niveau hypothalamique, le CRH inhibe la GnRH hypothalamique au niveau du noyau arqué. Cet effet pourrait être également médié par la β -endorphine provenant de la scission de la pro-opiomélanocortine (POMC) sous l'effet du CRH hypothalamique (**Chrousos et al., 1998**). De plus, les glucocorticoïdes exercent des effets inhibiteurs sur le neurone hypothalamique à GnRH, et sur les gonades en provoquant une diminution de la sensibilité des tissus cibles aux stéroïdes sexuels (résistance périphérique) (**Rabin et al., 1988**). Il est intéressant de noter qu'au cours de l'inflammation, les cytokines circulants suppriment les fonctions reproductrices en activant la sécrétion hypothalamique du CRH et des peptides dérivés du POMC et en inhibant par conséquent la stéroïdogénèse ovarienne et testiculaire (**Rivier et Rivest, 1991; Tsigos et al., 1999**).

Par ailleurs, le KTCZ intervient au niveau de la chaîne de biosynthèse des stéroïdes surrénaliens et gonadiques en agissant sur plusieurs enzymes d'hydroxylation (11 β hydroxylation and 18-hydroxylation) (**Engelhardt et al., 1985**) et provoque de ce fait une production abondante de prégnénolone et prégnénolone sulfate. Ces molécules et leurs métabolites tels que l'allopregnénolone sont classées parmi les stéroïdes neuroactifs (**Lambert et al., 1986; Uzunova et al., 1998**). L'allopregnénolone stimule la prolifération des cellules cérébrales et hippocampiques par l'intermédiaire des récepteurs GABAA et favorise la neurogénèse (**Brinton et Wang, 2006**). Ces structures cérébrales sont sensiblement altérées dans les troubles psychiatriques tels que la dépression.

Une attention croissante est portée ces dernières années aux effets centraux de la CsA et du KTCZ. Le mécanisme par lequel ces drogues pourraient agir au niveau central n'a pas encore été clarifié. Des études anciennes ont signalé que ces effets pourraient être associés à un dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique (**Sloane et al., 1985; Gottrand et al., 1991**).

Dans la présente étude, nous avons d'abord examiné l'effet de la CsA au niveau périphérique, ensuite nous avons analysé les effets

neuropharmacologiques, au niveau des tests de la nage forcée, du labyrinthe en croix surélevée, du test des champs ouverts et du labyrinthe de Morris. La FST (Forced Swimming Test), modèle animal de dépression, représente une situation stressante aversive d'où le rat ne peut échapper, et produit l'immobilité, c'est-à-dire un désespoir comportemental (**Borsini et Meli, 1988**). Le profil antidépresseur des drogues peut être examiné au moyen d'une FST, qui est l'un des essais les plus utilisés généralement pour évaluer l'activité antidépressive parce qu'il est sensible à toutes les classes importantes de drogues antidépressives (**Porsolt et al., 1977**). Au cours de la FST, les rats montrent des comportements actifs, c'est-à-dire nage et escalade, aussi bien que le comportement passif, c'est-à-dire immobilité. Les molécules qui diminuent la durée d'immobilité dans la FST sont considérés comme étant des antidépresseurs efficaces (**Porsolt et al., 1977**).

Cependant, un grand nombre d'études a porté sur l'association entre la dépression et l'inflammation (**Dantzer et al., 2008**; **Whooley et al., 2007**). Il a été démontré que les patients qui ont une dépression majeure, ont présenté des preuves de l'inflammation qui se manifeste par l'augmentation des cytokines inflammatoires y compris le facteur de nécrose tumorale (TNF)-alpha, l'interleukine (IL-1) et l'IL-6 dans le sang périphérique et le liquide céphalo-rachidien (**Miller et al., 2009**). Il faut noter que le traitement conventionnel avec un antidépresseur a été montré pour réduire les marqueurs de l'inflammation après un traitement réussi (**Miller et al., 2009**), et des expériences ont montré que les antidépresseurs peuvent inhiber la production des cytokines inflammatoires in vitro (**Kenis et Maes, 2002**). Pris ensemble, ces résultats ont contribué à une transformation majeure dans la compréhension de la physiopathologie de la dépression majeure et ont conduit à des efforts concertés pour identifier des cibles inflammatoires pour le développement de la nouvelle thérapie de la dépression. Il y a eu un intérêt croissant dans le rôle de facteurs de croissance, comme le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF) et la neurogenèse dans le développement et le traitement des troubles dépressifs (**Duman et Monteggia, 2006**). De nombreuses études chez les rongeurs ont montré que le stress induit une diminution du BDNF et de la neurogenèse (qui

sont associés à un comportement dépressif) sont liés d'une part à l'induction de cytokines immunitaires innées, y compris IL-1 (**Barrientos et al., 2004; Ben Menachem et al., 2008; Goshen et al., 2008; Koo et Duman, 2008**).

En plus de son activité immunosuppressive, la CsA présente un certain nombre de mécanismes d'action différents (**Zenke et al., 2001; Zhang et Liu, 2001**). Il est postulé que les propriétés anti-inflammatoires de ce médicament résulte principalement à partir de l'inhibition de la voie de transduction du signal dans les lymphocytes T activés, lymphocytes T auxiliaires principalement, qui contrôle la transcription d'un certain nombre de gènes, y compris ceux qui sont liés à des cytokines pro-inflammatoires (**Calderon et al., 1992, Wiederrecht et al., 1993**). Des études ont révélé que la CsA peut agir sur d'autres cellules que les lymphocytes, tels que les granulocytes et les cellules mononucléaires du système phagocytaire (**Fathman et Myers, 1992**).

Dans notre étude (Fig 14), nous avons constaté que le temps d'immobilité des rats traités au KTCZ, CsA et CsA +KTCZ est plus court par rapport aux rats témoins au deuxième jour de l'essai. Ceci dénote un effet antidépresseur-like de ces drogues. Cependant, cette diminution du temps d'immobilité peut se faire soit en faveur d'une augmentation du temps de nage, soit en faveur d'une augmentation du temps d'escalade. Cette différence est très importante du point de vue neuropharmacologique puisque théoriquement au cours de la FST, les antidépresseurs produisant une élévation noradrénergique ou dopaminergique prédominantes, réduisent l'immobilité par l'augmentation du temps d'escalade (**Lopez et Lucki, 2000**). En revanche, ceux qui activent plutôt la 5HT réduisent l'immobilité par l'augmentation de la nage (**Detke et al., 1995**). Cette sélectivité comportementale est maintenue même après le traitement à long terme, de ce fait, le traitement est compatible aux effets thérapeutiques chez l'homme (**Heninger et al., 1996**).

Dans nos résultats, nous avons constaté que le temps de nage mesuré chez les animaux traités à la CsA et CsA+KTCZ est prédominant. En revanche, chez les animaux traités au KTCZ seul, c'est plutôt le temps d'escalade qui est augmenté. Autrement dit, le KTCZ fait diminuer le temps

d'immobilité en faisant augmenter le temps d'escalade. Par contre, la CsA et la CsA+KTCZ font réduire le temps d'immobilité en faveur d'une augmentation du temps de nage. Autrement dit, le KTCZ fait activer davantage les voies noradrénergique ou dopaminergique, alors que la CsA font activer plutôt les voies sérotoninergiques. Un argument en faveur de cette déduction est l'hyperplasie médullaire; soulignant que la medulla surrénalienne est une source importante de production d'adrénaline et de noradrénaline.

A ce titre, plusieurs études ont montré que l'administration de KTCZ diminue l'hypercortisolémie et améliore la dépression (**Murphy, 1997**). Dans ce sens, il est plutôt plausible de référer la réduction de l'immobilité à l'inhibition de la corticostérone. En effet, il a été démontré qu'au cours de la nage forcée, les hormones corticoïdes régulent le temps d'immobilité (**Mitchell et Meaney, 1991**).

Baèz et Volosin (1994) notent une élévation de la corticostérone accompagnée d'une augmentation du temps d'immobilité au cours de la nage forcée chez les rats. L'adrénalectomie chirurgicale entraîne une diminution du temps d'immobilité durant la période du re-test de 5 minutes (2^{ème} FST) (**Mitchell et Meaney, 1991; Veldhuis et al., 1985; De Kloet et al., 1988**). En revanche, l'administration de la corticostérone (1mg/Kg) au premier jour du test après 15 minutes (1^{ère} FST), augmente le temps d'immobilité le deuxième jour du test (2^{ème} FST). La Dexaméthasone (dose dépendante) abolie cet effet (**Mitchell et Meaney, 1991; De Kloet et al., 1988**). Le metyrapone (120 mg/Kg) (bloque la 11 beta-hydroxylase) injecté 3h avant la 1^{ère} FST réduit significativement le temps d'immobilité. Cet effet est reversé par la corticostérone (dose-dépendante).

Il a été rapporté que la CsA stimule l'activité neuronale sérotoninergique chez la souris. Cette action de stimulation de la cyclosporine sur les neurones à sérotonine dans le cerveau peut être étroitement liée à l'apparition d'effets indésirables centraux: comme les tremblements, les convulsions et l'encéphalopathie. La CsA fait augmenter de façon significative les niveaux de sérotonine, mais pas la noradrénaline ou la dopamine dans le cerveau de la souris. L'intervention des stéroïdes neuroactifs, que nous avons abordé plus

haut (**Rupprecht et al., 1998**) représente une explication possible au sujet de l'effet d'antidépresseur du KTCZ (**Murphy et al., 1998**). **Rex et al. (2004)**, a prouvé que l'alloprégnénone produit une action antidépressive-like chez le rat au cours de la FST (**Hirani et al., 2002**) où il a enregistré une réduction du temps d'immobilité et une augmentation du temps d'escalade. Nous pouvons suggérer que le KTCZ a provoqué une augmentation du temps d'escalade suite à une élévation dopaminergique (**Dazzi et al., 2002**; **Reneric et Lucki, 1998**) ou noradrénergique (**Detke et Lucki, 1995**). Cette activation est probablement médiée par l'alloprégnénone par le biais d'une modification de la voie GABA èrgique en agissant sur les récepteurs GABA-A (**Estrada-Camarena et al., 2002**). Il a été démontré que l'alloprégnénone augmente l'activité des récepteurs GABA-A en stimulant l'influx des chlorides au niveau de plusieurs régions cibles des antidépresseurs appartenant au système limbique, telles que l'amygdale, l'hippocampe et le cortex cérébral (**Wilson et Biscardi, 1997**) et que l'alloprégnénone fait augmenter la dopamine au niveau du noyau accumbens (**Rougé-Pont et al., 2002**). Chez les malades déprimés, le niveau plasmatique de l'alloprégnénone est diminué (**Romeo et al., 1998**). Les femmes qui souffrent d'un syndrome prémenstruel (**Dubrovsky, 2000**) présentent une dysrégulation au niveau de la production de l'alloprégnénone qui est associée aux désordres comportementaux (**Freeman et al., 2002**).

Cependant, les effets du traitement par la CsA sur l'activité exploratoire et émotionnelle chez les rats n'a pas été étudiée en détail. Ainsi, la présente expérience a été réalisée pour analyser les effets induits par la CsA sur l'activité locomotrice et exploratoire chez le rat mâle Wistar en utilisant le test des champs ouverts (OF). Le test a été choisi parce qu'il est sensible aux manipulations pharmacologiques (**Walsh et Cummins, 1976**). Sous constante, les conditions d'essai clairement définies ont une grande fiabilité et la validité de la mesure de l'activité émotionnelle (**Denenberg, 1969**), et les comportements liés à l'anxiété vers un nouvel environnement (**Walsh et Cummins, 1976**). Dans notre étude, le traitement des rats mâles Wistar par la CsA diminue de manière hautement significative l'activité locomotrice des rats (Fig 15). Cet effet peut être du à l'altération au profil des cytokines induits

par la CsA. Une étude récente de **Von Hörsten et al. (1998)** a montré que le traitement avec la CsA induit des modifications transitoires de l'activité ambulatoire, la défécation, et l'activité d'élevage chez les rats mâle DA (Dark Agouti). D'autre part, il a été montré qu'une seule injection systémique de CsA (60 mg / kg) a diminué l'activité locomotrice des souris pendant 24 h (**Sato et al., 2007**).

Le plus maze test est l'un des modèles de comportement les plus populaires pour l'anxiété. L'augmentation du nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts sont considérés comme étant les indices les plus représentatifs de l'activité anxiolytique. Dans ce dispositif, les rats préfèrent normalement passer beaucoup de leur temps dans les bras fermés. Ce comportement semble refléter une aversion envers les bras ouverts qui est généré par la peur des espaces ouverts. Les médicaments qui augmentent l'exploration des bras ouverts sont considérés comme anxiolytiques et l'inverse est vrai pour les anxiogènes (**Nic Dhonnchadha et al, 2003**). Dans nos résultats (Tab 03), des niveaux bas d'anxiété ont été soulignés chez les animaux traités au KTCZ, CsA et KTCZ+CsA où ils manifestent des comportements anxiolytiques (passent plus de temps dans les bras ouverts, les parties distales des bras ouverts et au centre du dispositif, nombre d'entrées et locomotion importants,...). Cet effet pourrait également être le reflet de l'inhibition de la corticostérone ou de la production de l'allopregnénolone. Des études récentes se sont intéressées à tester l'effet du KTCZ chez des rats exposés au parfum de chat. Ils ont noté que le traitement au KTCZ a supprimé les effets comportementaux anxieux chroniques du rat en réponse à l'exposition aiguë au parfum de chat. Cette variation du comportement, accompagnée d'une diminution des taux plasmatiques de corticostérone, démontre que la corticostérone pourrait être un médiateur important des troubles comportementaux (**Cohen et al., 2006**). Les émotions négatives comme l'anxiété et la dépression provoquent l'augmentation du risque des troubles avec une étiologie inflammatoire, et l'élévation de l'activité inflammatoire peut être un médiateur important des relations émotion-maladie (**Kiecolt-Glaser et al., 2002**). De plus, un niveau de cytokines pro-inflammatoires accru a été signalé comme étant augmenté

chez le modèle comportemental d'anxiété chez des souris (**Sakic et al., 1994; Schrott et Crnic, 1996**). Des études cliniques ont également trouvé une association entre l'augmentation des niveaux de marqueurs de l'inflammation avec le développement de l'anxiété (**Arranz et al., 2007; Pitsavos et al., 2006**). Une corrélation négative a également été rapportée comme la délétion du gène de IFN-gamma, les cytokines pro-inflammatoires, ont été signalé comme ayant augmenté le comportement d'anxiété chez les rongeurs (**Fiore et al., 1998; Lesch, 2001**).

Les réactions comportementales, neurochimiques et endocriniennes décrites ci-dessus pourraient être concomitantes à de multiples réactions immunitaires. A ce titre, **Connor et al. (1997)** ont pu caractériser les réponses corticotrope et immunitaire et examiner les niveaux des neurotransmetteurs dans cinq régions du cerveau à des intervalles de temps de 5, 30, 60, 90 et 120 minutes suite à la nage forcée. Ils ont souligné une diminution significative et transitoire des concentrations de noradrénaline et 5-Hydroxytryptamine (5-HT) au niveau de l'hypothalamus, 15 minutes après la FST. Le turn-over de la 5-HT a significativement augmenté entre 20 et 120 minutes au niveau du cortex frontal et de l'amygdale. La corticostérone a présenté un taux très important à 90 minutes, par contre le nombre des leucocytes totaux a diminué au bout de 120 minutes accompagné d'une réduction du pourcentage des lymphocytes entre 90 et 120 minutes.

Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme après l'administration de catécholamines où deux phases ont été identifiées: une mobilisation rapide (<30minutes) des lymphocytes, suivie d'une augmentation des granulocytes avec la lymphopénie relative (réponse maximale à 2-4h) (**Benschop et al., 1996**). Les catécholamines affectent principalement les cellules de NK, tandis que les nombres de lymphocytes T et B demeurent relativement inchangés. Ceci confirme encore une fois l'implication de la noradrénaline retrouvée dans nos résultats (augmentation du temps d'escalade). Ces catécholamines (adrénaline et noradrénalines) régulent le système immunitaire en agissant respectivement par l'intermédiaire des récepteurs alpha α et β (**Landmann, 1992**).

Ces différences de réactivité du système immunitaire pourraient être tributaires de l'implication des cytokines pro-inflammatoires dont le rôle dans l'apparition des troubles comportementaux a été longtemps contesté. Il a été suggéré qu'une production accrue des cytokines pro inflammatoires IL-2, IL-6 et TNF- α soit impliquée en étiologie de la dépression (**Maes et al., 1999**). Une étude récente par **Jozuka et al. (2003)** a prouvé qu'une réduction d'activité et d'augmentation de NK, du niveau IL-2 semble être associée à la dépression. L'IL-10 également joue un rôle probable (**Mesquita et al., 2008**). L'interféron-alpha augmente l'immobilité au cours de la nage forcée chez le rat (**Makino et al., 2000a; Makino et al., 2000b**). Ces dernières années des études ont démontré que la dépression est concomitante de l'effet de l'IL-6. L'administration de l'IL-6 au niveau de l'amygdale et de l'hippocampe augmente le temps d'immobilité (**Wu et Lin, 2008; Yamada et al., 2000**) puis **Simen et al. (2006)**, ont montré que le Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha) est un modulateur important au niveau du système nerveux central des réactions émotionnelles. La CsA est un puissant immunosuppresseur qui supprime IL-1, IL-2 et TNF-alpha dans la périphérie. Elle empêche également les diminutions de 5-HT et les niveaux de noradrénaline (**Cheiko et al., 2003**). Il a été rapporté que la CsA agit comme un antidépresseur dans les tests comportementaux et peut aussi réguler les niveaux élevés de monoamine dans le cerveau de rats soumis à un stress (**Cheiko et al., 2003**).

L'apprentissage et la mémoire sont grandement affectées par le stress et la dépression. Les expériences de stress aiguë (**Kuhlmann et al., 2005**) ou chronique peuvent être plus sensibles aux déficits de la mémoire par rapport aux situations non stressantes, en particulier dans le learning spatial dépendant l'hippocampe (**Conrad, 2010**). L'hippocampe semble également être un site anatomique en corrélation avec la dépression (**Xu et al., 1997; Yang et al., 2005**). De plus, l'hippocampe, une structure sous-corticale importante dans le cerveau des mammifères, semblerait impliqué dans plusieurs types de processus d'apprentissage et de mémoire (**Bannerman et al., 2002; Riedel et al., 1999**). Il est également connu en tant que une

structure cible pour les différents types des stéroïdes neuroactifs, tels que les androgènes (**Edinger, 2004; Frick, 2009**).

Dans nos résultats au test de Morris (Fig 13), le KTCZ cause un déficit dans la mémoire de références chez les rats, révélée par l'augmentation du temps de latence et une diminution du nombre d'entrées et le temps passé dans le quadrant cible. Des études récentes ont mené afin d'expliquer le mécanisme par lequel la corticostérone agit sur les processus de mémoire (**Piérard et al., 2006**), la corticostérone affecte rapidement et transitoirement le rappel contextuel de l'information, l'activité de modulation de l'hippocampe par un mécanisme qui est rapide et probablement non-génomique (**Johnson et al., 2005**). Bien que, la mémoire à court terme est affaiblie par adrénalectomie et restaurée après l'administration ip de l'agoniste de corticostérone et de la dopamine dans le cortex préfrontal (**Mizoguchi et al., 2003**). Toutefois, le cerveau semble également déclencher la sécrétion de la corticostérone par un mécanisme indépendant de la réponse hormonale classique (CRF/ACTH), via l'activation sympathique des glandes surrénales (qui est, une ACTH indépendant mécanisme). Il a été rapporté que l'administration de CsA améliore les troubles d'apprentissage et la rétention de la mémoire (**Saito et al., 2010**). Récemment, le rôle de la CsA comme neuroprotecteur a été documentée dans plusieurs modèles animaux (**Sullivan et al., 2011; Osman et al., 2011**). L'administration chronique de CsA modifie l'expression du BDNF et TrkB dans l'hippocampe et le mésencéphale des rats (**Chen et al., 2010**). Les animaux traités par la CsA affichent une récupération fonctionnelle du comportement malgré le manque de neurogenèse dans le tissu cortical régénéré (**Erlandsson et al., 2010**). De plus, la cyclosporine A est largement utilisée comme inhibiteur de la calcineurine (**Halloran et al., 1999**).

Dans la présente étude, en utilisant le labyrinthe de Morris, nous avons démontré que l'inhibition pharmacologique de la calcineurine provoque l'augmentation de l'apprentissage spatial. Nos résultats indiquent que les injections de CsA ont entraîné une diminution de l'activité de la calcineurine dans l'hippocampe dorsal et une difficulté accrue dans le passage à de nouvelles demandes de tâche, d'une manière dépendante de la dose, en

dépit des preuves indiquant l'absence de déficit dans la capacité à apprendre de nouvelles informations. L'inhibition de la calcineurine a augmenté le taux et la rétention de l'apprentissage en tâches comportementales impliquant la reconnaissance d'objets, conditionnement de la peur, et l'apprentissage spatial (**Ikegami et Inokuchi, 2000; Malleret et al., 2001**). Enfin, il a été démontré que la calcineurine est associée avec la schizophrénie (**Eastwood, 2005; Gerber et al., 2003; Miyakawa, 2003**).

V. CONCLUSION

Il existe des mécanismes neuro-anatomiques, hormonaux et moléculaires multiples par le biais desquels le système nerveux central communique avec le système immunitaire, et en particulier avec les lymphocytes. Des perturbations au niveau des principaux systèmes de neurotransmission du SNC (dopaminergique, noradrénergique, sérotoninergique) et de l'axe corticotrope tel qu'observées dans des désordres psychiatriques, sont tributaire des changements de la fonction et du métabolisme des lymphocytes.

Ces changements sont très sensibles à l'expression des peptides neuroactifs tels que la neurotrophine (alloprégnénone, etc.), les hormones, les nombreuses cytokines, leurs récepteurs, et leurs gènes. Les similitudes dans les propriétés de récepteur et les processus de transduction des lymphocytes et du CNS, suggèrent que les lymphocytes peuvent en effet servir d'outils de base (biomarqueurs) indispensables dans la recherche sur la pathologie du SNC dans des désordres psychiatriques.

Des méthodes moléculaires spécifiques pour des analyses d'expression de gènes au niveau des cellules immunitaires nous permettraient d'étudier les interactions neuro-immunologiques dans des désordres psychiatriques à l'échelle moléculaire, et nous fourniraient des informations intéressantes concernant le potentiel de ces cellules.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ader R. 1981.** Psychoneuroimmunology. Academic Press, New York. 321.
- Aitken. R.J., and McLaughlin. EA. 2007.** Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of a capacitated state. Soc Reprod Fertil Suppl .63:273-93.
- Agarwal. A., Makker. K., and Sharma. R. 2008.** Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. Am J Reprod Immunol.59:2-11.
- Albrechet-Souza. L., Milene. CDC., Celso. R.F., and Marcuse. LB. 2007.** Increases in plasma corticosterone and stretched-attend postures in rats naive and previouslylytic-like effects of mizolam. Hormones and Behavior
- Alexandro Da Silva. H., Angela. And S., Alethea Gatto. B.2007.** Oxydative stress parameters in diabetic rats submitted to forced swimming test, the Clonazepam effect. Brain Research. 1154: 137-143
- Arranz L, Guayerbas N, and De la Fuente M. 2007.** Impairment of several immune functions in anxious women. J Psychosom Res. 62: 1-8.
- Arzt. E., Buric. R., Stelzer. G., Stalla. J., Renner. U., and Stalla. G.K. 1993.** Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. Endocrinology. 132: 459-467.
- Baez. M., and Volosin, M. 1994.** Corticosterone influences forced swimming induced immobility. Pharmacol. Biochem. Behav. 49: 729-736.
- Barrientos. LG., Lasala, F., Delgado, R., Sanchez, A., and Gronenborn, AM. 2004.** Flipping the switch from monomeric to dimeric CV-N has little effect on antiviral activity. Structure.12: 1799–1807.
- Ben Menachem-Zidon. O., Goshen. I., Kreisel. T., Ben Menahem. Y., Reinhartz. E., Ben Hur. T., and Yirmiya. R. 2008.** Intrahippocampal transplantation of transgenic neural precursor cells overexpressing interleukin-1 receptor antagonist blocks chronic isolation-induced impairment in memory and neurogenesis. Neuropsychopharmacology, 33:2251- 2262.

Beauchesne. P.R., Chung, N.S., and Wasan, K.M, 2007. Cyclosporine A: a review of current oral and intravenous delivery systems. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 33, 211–220.

Benschop, R.J., Rodriguez-Feuerhahn, M., and Schedlowski, M. 1996. Catecholamine-induced leukocytosis: Early observations, current research, and future directions. *Brain Behav. Immun.* 10:77–91.

Besedovsky. HO., and Del Rey. A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: Facts and hypotheses. *Endocr. Rev.* 17:64–102.

Boissier. JR., and Simon. P. 1965. Action de la caféine sur la motilité spontanée de la souris. *Arch. Intpharmacodyn.* 1965 ; 158: 212-221.

Borel. JF., Feurer. C., Gubler. HU., and Stahelin H. 1976. Biological effects of CsA: a new antilymphocytic agent. *Agents and Actions* .6:468–75.

Borlongan. CV., Stahl. CE., Cameron. D., Saporta. S., Freeman. TB., Cahill. D.W., and Sanberg, P.R. 1996. CNS immunological modulation of neural graft rejection and survival. *Neurol. Res.*, 18: 297-304.

Borlongan. CV., Fujisaki. T., and Watanabe. S. 1997. Chronic administration of Cyclosporine-A does not impair memory retention in rats. *Neuro Report.* 8 :673-676.

Borlongan, CV., Stahl, CE., Fujisaki, T., Sanberg, PR. and Watanabe, S. 1999. Cyclosporine A-induced hyperactivity in rats: is it mediated by immunosuppression, neurotrophism, or both? *Cell Transplant.* 8: 153-159

Borlongan. CV., Stahl. C E., Keep. MF., Elmér. E., and Watanabe. S. 2000. Cyclosporine-A enhances choline acetyltransferase immunoreactivity in the septal region of adult rats. *Neuroscience Letters.* 279 : 73-76

Borsini. F., and Meli. A. 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? *Psychopharmacology* 94:147–160.

Brinton RD. and Wang JM. 2006. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. *Curr Alzheimer Res.*3(3):185–190.

Brunelli. R., Frasca. D., Fattorossi. A., Spano. M., Baschieri. S., D'Amelio. R., Zichela. L., And Doria, G., 1991. Thymus regeneration induced by gonadectomy in old mice. Characterization of T cell phenotype and mitotic responsiveness. *Journal of Immunology Research*, 3: 62–68.

Butcher. SP., Henshall. DC., Teramura. Y., Iwasaki. K., and Sharkey. J. 1997. Neuroprotective actions of FK506 in experimental stroke: in vivo evidence against an antiexcitotoxic mechanism. *J. Neurosci.* 17: 6939-6946.

Calderon, E., Lockey, RF., Bukantz, SC., Coffey, RG., and Ledford, DK., 1992. Is there a role for cyclosporine in asthma? *J. Allergy Clin. Immunol.* 89, 629-636.

Cheiko. F., Masanori. U., Yasukazu. K., Akiko. W., Heinrich. S., Shigeru W., Masanobu K., and Katsuiku H. 2003. An immunosuppressive drug cyclosporine acts like antidepressant for rats under unpredictable chronic stress. *J Med Dent Sc.* 50: 938-100.

Chen. Y., Qiao. S., Tuckermann. J., Okret. S. and Jondal. M. 2010. Thymus derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis. *FASEB J.* 24(12):5043-51

Chrousos. GP., Torpy. DJ. and Gold PW. 1998. Interactions between the hypothalamic pituitary adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Annals of Internal Medicine.* 129 (3):229–240.

Cohen. H., Zohar. J., Gidron. Y., Matar. MA., Belkind. D., Loewenthal. U., Kozlovsky. N. and Kaplan. Z. 2006. Blunted HPA axis response to stress influences susceptibility to posttraumatic stress response in rats. *Biol. Psychiatry.* 1559: 1208-1218.

Connor. TJ., Kelly. JP. and Leonard. BE. 1997. Forced swim test-induced neurochemical, endocrine, and immune changes in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 58 (4): 961-7.

Dantzer. R., O'Connor. JC., Freund. GG., Johnson. RW. and Kelley KW. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 9:46-56.

Dawson. GR., Crawford. SP., Collinson. N., Iverson. SD. and Tricklebank. MD.1995. Evidence that the anxiolytic-like effects of chlordiazepoxide on the elevated plus maze are confounded by increases in locomotor activity. *Psychopharmacology (Berl)* .118: 316-323.

Dazzi, L., Serra. M., Vacca. G., Ladu. S., Latrofa. A., and Biggio. G. 2002. Depletion of cortical allopregnanolone potentiates stress-induced increase in cortical dopamine output. *Brain Res.* 932:165-139.

Deak. T., Bellamy. C. And D'Agostino. LG. 2003. Exposure to forced swim stress does not alter central production of IL-1. *Brain Research.* 972: 53-63.

Denenberg, V. H. 1969. Open-field behavior in the rat: What does it mean? *Ann. NY Acad. Sci.* 159:852-859.

Deuschle. M., Lecei. O., Stalla. GK., Landgraf. R., Hamann. B., Lederbogen. F., Uhr. M., Lupp. P., Maras. A., Colla. M. and Heuser I. 2003. Steroid synthesis inhibition with ketoconazole and its effect upon the regulation of the hypothalamus–pituitary–adrenal system in healthy humans. *Neuropsychopharmacology* . 28, 379-383.

Detke. M.J. and Lucki I. 1995. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: The effects of water depth. *Behav. Brain Res.* 73: 43-46.

De Kloet. ER., De Kock. S., Schild. V. and Vedhuis HD.1988. Antigluco-corticoid RU38486 attenuates retention of a behavior and disinhibits the hypothalamic-pituitary adrenal axis at different brain sites. *Neuroendocrinology* . 47 (2): 109-15.

De Groen. PC., Aksamit. AJ., Rakela. J., Forbes. GS. and Krom RA.1987. Central nervous system toxicity after liver transplantation. The role of cyclosporine and cholesterol. *N Engl J Med.* 317:861-866

Dubrovsky B. 2000. The specificity of stress responses to different nocuous stimuli: neurosteroids and depression. *Brain Res Bull.* 51:433-455.

Duman. RS, and Monteggia LM. 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 59: 1116-27.

Eastwood, SL. Burnet, PWJ. and Harrison, P. 2005. Decreased hippocampal expression of the susceptibility gene PPP3CC and other calcineurin subunits in schizophrenia. *Biol. Psychiatry.* 57:702-710.

Edinger. KL., Lee. B., and Frye CA. 2004. Mnemonic effects of testosterone and its 5alpha-reduced metabolites in the conditioned fear and inhibitory avoidance tasks. *Pharmacol Biochem Behav.* 78(3):559-68.

Engelhardt, D., Dorr, G., Jaspers, C., and Knorr, D. 1985. Ketoconazole blocks cortisol secretion in man by inhibition of adrenal 11b-hydroxylase. *Klin. Wochenschr.* 63:607-612.

Erlandsson. A., Lin. CH., Yu. F., and Morshead CM. 2011. Immunosuppression promotes endogenous neural stem and progenitor cell migration and tissue regeneration after ischemic injury. *Exp Neurol.* 230:48857.

Estrada-Camarena, E., Contreras. CM., Savedra. M., Luna-Baltazar. I., and Lopez-Rubalcava C. 2002. Participation of the lateral septal nuclei (LSN) in the antidepressant-like actions of progesterone in the forced swimming test (FST). *Behav. Brain Res.* 134: 175-183.

Faulds, D.; Goa, KL. and Benfield, P. 1993. Cyclosporin A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders. *Drugs.* 45:953-1040.

Fathman. CG, and Myers. BD.1992. Cyclosporine therapy for autoimmune disease. *N Engl J Med.* 326:1693-1695.

File. SE., Zangrossi. HJR., Sanders. FL. and Mabbutt PS. 1994. Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze. *Psychopharmacology (Berl);* 113:543-546,

Freeman, EW., Frye, CA., Rickels, K., Martin, PA., Smith, SS. 2002. Allopregnanolone levels and symptom improvement in severe premenstrual syndrome. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22:516- 520.

Fiore M, Alleva E, Probert L, Kollias G, Angelucci F, and Aloe L. 1998. Exploratory and displacement behavior in transgenic mice expressing high levels of brain TNF-alpha. *Physiol Behav* .63: 571–576.

Friberg, H., Ferrand-Drake, M., Bengtsson, F., Halestrap, AP. and Wieloch, T. 1998. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.*, 18 :5151-5159.

Frih. H., Sahraoui. L., Frih. N., Toumi. L., Bairi. A., Tahraoui. A., Maurel. D., and Siaud. P. 2009. Facteurs prédictifs de la survenue du stress post traumatique chez des individus ayant vécu deux évènements de vie majeurs (tremblement de terre et terrorisme en Algérie): réponse corticotrope et prolactinique à une faible dose de Dexamethazone (0.5mg). *L'Evolution psychiatrique*. 74 :581–591

Frih. H., Ali Rachedi. B., Djenidi. R., Frih. N., Tahraoui. A. and Bairi AM., 2010. Le Ketoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Canadian journal of Physiology and Pharmacology*. 88: 733-744.

Frick. KM. 2009. Estrogens and age-related memory decline in rodents: what have we learned and where do we go from here? *Horm Behav*. 55:2-23.

Gaffari. T., Mustafa. S., Ali Osman. Ç., Abdurrauf. Y., and Ahmet. A. 2010. Attenuation of cyclosporine A-induced testicular and spermatozoal damages associated with oxidative stress by ellagic acid. *International Immunopharmacology*. 10: 177-182.

Gennady. NS and Goeders NE. 2004. Effects of acute and chronic ketoconazole administration on hypothalamo–pituitary–adrenal axis activity and brain corticotropin-releasing hormone. *Psychopharmacology* . 23-1228.

Gerber. D.J., Hall. D., Miyakawa. T., Demars. S., Gogos. J.A., Karayiorgou. M., and Tonegawa. S. 2003. Evidence for association of schizophrenia with genetic variation in the 8p21.3 gene, PPP3CC, encoding the calcineurin gamma subunit, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 :8993-8998.

Goshen. I., Kreisel. T., Ben-Menachem-Zidon. O., Licht. T., Weidenfeld. J., Ben-Hur. T., and Yirmiya R. 2008. Brain interleukin-1 mediates chronic stress-induced depression in mice via adrenocortical activation and hippocampal neurogenesis suppression. *Mol Psychiatry*. 13:717-28.

Gottrand. F. Largilliere. C., and Farriaux. JP. 1991. Cyclosporine neurotoxicity (letter). *N Engl J Med*. 324-1744.

Greenstein. BD., Fitzpatrick. F., Adcock. IM., Kendall. MD., and Wheeler MJJ. 1986. Reappearance of the thymus in old rats after orchidectomy: Inhibition of regeneration by testosterone. *J Endocrinol* ;17-422.

Grossman C.J. 1985. Interaction between the gonadal steroids and the immune system. *Science* . 227:255-261.

Hall. CS. 1934. Emotional behaviour in the Rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol*. 385-403.

Hall, C. S. 1938. The inheritance of emotionality. *Sigma Xi Q*. 26: 17-27.

Halloran, P. F., L. M. Helms, L. Kung and J. Noujaim. 1999. The temporal profile of calcineurin inhibition by cyclosporine in vivo. *Transplantation*. 6: 1356-1361.

Handley SL et Mithani S. 1984. Effects of alpha-adrenoreceptor agonists and antagonists in maze exploration model of « fear »-motivated behavior. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* . 327.

Handelsman. DJ., McDowell. IFW., Caterson. ID., Tiller. D., Hall, BM. and Turtel. JR.1984. Testicular function after renal transplantation: comparison of cyclosporine a with azathioprine and prednisone combination regimes. *Clin. Nephrol*. 22 : 144-148.

Heninger, G.R., Delgado, P.L. and Charney, D.S. 1996. The revised monoamine theory of depression: a modulatory role for monoamines, based on new findings from monoamine depletion experiments in humans. *Pharmacopsychiatry* . 29: 2 -11.

Herbert. TB., and Cohen C. 1993. Depression and immunity: a meta-analytic review. *Psychol.Bull.*113: 472-486.

Hess, AD., Tutshka. PJ., Santos. GW., and Pu. Z. 1982. Effect of cyclosporine A on lymphocyte response in vitro. *J. Immunol.* 128:355-367.

Hirano, T., Oka, K., Takeuchi, H., Sakurai, E., Matsuno, N., Tamaki, T., and Kozaki, M.,1994. Clinical significance of glucocorticoid pharmacodynamics assessed by antilymphocyte action in kidney transplantation. Marked difference between prednisolone and methylprednisolone. *Transplantation.* 57, 1341–1348.

Hirani. K., Khisti. R.T., and Chopde. C.T. 2002. Behavioral action of ethanol in Porsolt's forced swim test: modulation by 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one. *Neuropharmacology.* 43:1339–1350.

Hirokawa K., Okayasu I., Hatakeyama Hatakeyama S. 1979. Effect of pregnancy and its related hormones on the in vitro proliferation of spleen cells. *Acta Pathol Japon .* 29:837–844.

Hirokawa K., Sato K., Makinodan T. 1982. Influence of age of thymic graft on the differentiation of T cells in nude mice. *Clin.Immunol.Immunop.;* 24:251–262

Holsboer F.2001. Prospects for antidepressant drug discovery. *Biol. Psychol.* 57:47- 65.

Ikegami. S., and Inokuchi. K. 2000. Antisense DNA against calcineurin facilitates memory in contextual fear conditioning by lowering the threshold for hippocampal long-term potentiation induction. *Neuroscience.* 98: 637-646.

Ishiyama. N., Kitagawa. M., Kina. I., and Hirokawa K. 1998. Expression of truncated VCAM-1 in thymocytes and its role during the process of apoptosis. *Pathobiology .* 66:274–283

Johnson. LR., Farb. C., Morrison. JH., McEwen. BS., and LeDoux JE. 2005. Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience .* 136:289-99.

Jozuka. H., Jozuka. E., Takeuchi. S. and Nishikaze. O. 2003. Comparison of immunological and endocrinological markers associated with major depression. *J. Int. Med. Res.* 31: 36-41.

Kahan, BD. 1989. Cyclosporine. *N. Engl. J. Med.* 321:1725–1738.

Kahan, GD., Flechner, SM., Lorber, MI., Golden, D., Conley, S., and Van Buren, CT. 1987. Complication of cyclosporine-prednisone immunosuppression in 402 renal allograft recipients exclusively followed at a single center for from one to five years. *Transplantation* 43:197-204.

Kahan, BD. 1994. Role of cyclosporine: Present and future. *Transplant. Proc.* 26:3082-3087.

Karanth. S., Lyson. K. and McCann. SM. 1993. Role of nitric oxide in interleukin 2-induced corticotropin releasing factor release from incubated hypothalami. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 3383-3387.

Kenis G, Maes M. 2002. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *Int J Neuropsychopharmacol.* 5:401–12.

Kiecolt-Glaser. JK., McGuire. L., Robles. TF., and Glaser. R. 2002. Psychoneuroimmunology: psychological influences on immune function and health. *J Consult Clin Psychol.* 70(3):537-47.

Kitamura, Y., Itano, Y., Kubo, T. and Nomura, Y. 1994. Suppressive effect of FK-506, a novel immunosuppressant, against MPTP-induced dopamine depletion in the striatum of young C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol.* 50 :221-224.

Koo. JW., and Duman RS. 2008. IL-1beta is an essential mediator of the antineurogenic and anhedonic effects of stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:751-756.

Kruger, TE., Smith. LR., Harbour. DV., and Blalock. JE. 1989. Thyrotropin: an endogenous regulator of the in vitro immune response. *J Immunol.* 142:744-747.

Kuhlmann. S., Kirschbaum. C., and Wolf. OT . 2005. Effects of oral cortisol treatment in healthy young women on memory retrieval of negative and neutral words. *Neurobiol Learn Mem* 83:158-162.

Kunzendorf . U., Brockmuller. J., Jochimsen. F., 1988. Cyclosporine and CNS toxicity. *Lancet.* 1:1223.

Lambert A., Mitchell R. And Robertson W.R. 1986. The effect of Ketoconazole on adrenal and testicular steroidogenesis in vitro. *Biochemical Pharmacology* .22: 3999-4004.

Landmann R. 1992. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulation. *Eur. J. Clin. Investig.* 22: 1–30.

Laye. S., Bluthé. R., M., Kent. S., Combe. C., Medina. C., Parnet. P., Kelley. K. and Dantzer, R. 1995. Subdiaphragmatic vagotomy blocks induction of IL-1 beta mRNA in mice brain in response to peripheral LPS. *Am. J. Physiol.* 1327–1331.

Lesch KP. 2001. Mouse anxiety: the power of knockout. *Pharmacogenomics J.* 1: 187–192.

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

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

MacAdams. MR., White. RH. and Chipps BE. 1986. Reduction in serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann. Intern. Med.* 140:648–651.

Madden. KS., Felten. SY., Felten. DL. And Bellinger DL. 1995. Sympathetic nervous system--immune system interactions in young and old Fischer 344 rats. *Ann N Y Acad Sci.* 771:523-34.

Maes. M., Lin AH and Delmeire. L. 1999. Elevated serum interleukin-6 (IL-6) and IL-6 Receptor concentrations in posttraumatic stress disorder following accidental man-made traumatic events. *Biol. Psychiatry.* 45: 833-839

Makino M. 1998. Enhancement of immobility in mouse forced swimming test by treatment with human interferon. *Eur. J. Pharmacol.* 356, 1-7.

Makino. M., Kitano. Y., Komiyama. C., Hirohashi. M., Kohno. M., Moriyama. M., and Takasuna K. 2000a. Human interferon-alpha induces immobility in the mouse forced swimming test: involvement of the opioid system. *Brain Res.* 852 (2): 482-4.

Makino. M., Kitano. Y., Komiyama. C., and Takasuna. K. 2000b. Human interferon-alpha increases immobility in the forced swimming test. *Psychopharmacology.* 148 (1): 106-10.

Malleret, G., Haditsch, U ., Genoux, D., Jones, MW., Bliss, TV., Vanhose, AM., Weitlauf, C., Kandel, ER., Winder, DG., and Mansuy. IM 2001. Inducible and reversible enhancement of learning, memory, and long-term potentiation by genetic inhibition of calcineurin. *Cell,* 104 :675-686.

Martoja. R., and Martoja M, 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Paris, France: Masson et Cie .345p.

Mason, J. 1990. The pathophysiology of Sandimmune (cyclosporine) in man and animals. *Pediatr. Nephrol.* 4:686-704.

Masuda, H., Fujihira. S., Ueno. H., Kagawa. M., Katsuoka. Y., and Mori H. 2003. Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. *Med Electron Microsc.* 36:183-91.

Matsuura, K., Makino, H. and Ogawa, N., 1997. Cyclosporin A attenuates the decrease in tyrosine hydroxylase immunoreactivity in nigrostriatal dopaminergic neurons and in striatal dopamine content in rats with intrastriatal injection of 6- hydroxydopamine. *Exp. Neurol.*146 :526-535.

Mesquita. A.R., Correia-Neves. M., Roque. S., Castro. A.G., Vieira. J., Palha. J.A., and Sousa N. 2008. IL-10 modulates depressive-like behaviour. *J Psychiatr Res.* 43(2):89-97.

Mihatsch MJ., and Wolff, K. 1992. Consensus conference in cyclosporine A for psoriasis Br, J . Dermatol. 126:621-623.

Miller, A.H., Maletic, V., and Raison, C.L. 2009. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. Biol. Psychiat. 65 (9), 732–741.

Misro. MM., Chaki. SP., Srinivas. M. and Chaube SK. 1999. Effect of cyclosporine on human sperm motility in vitro. Arch Androl. 43:215-20.

Mitchell. J.B., and Meaney. M.J., 1991. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. Behav. Neurosci. 105: 798-803.

Miyakawa. T., . Leiter. LM., Gerber. DJ., Gainetdinov. RR., Sotnikova. TD., Zeng. H., Caron. MG., and Tonegawa. S. 2003. Conditional calcineurin knockout mice exhibit multiple abnormal behaviors related to schizophrenia. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:8987-8992.

Mizoguchi. K., Ishige. A., Aburada. M., and Tabira T. 2003. Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. Neuroscience. 119: 887-897.

Monteiro. JC., Predes. FS., Matta. SLP., Dolder. H. 2008. Heteropterys aphrodisiaca infusion reduces the collateral effects of cyclosporine A on the testis. Anat Rec . 291: 809-17.

Montgomery KC. 1955. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J Comp Physiol Psychol. 48: 254-260.

Morris R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. J Neurosci Methods. 11: 47-60.

Munck. A., Naray-Fejes-Toth. A. And Guyre .PM. 1987. Mechanism of glucocorticoid actions on the immune system. In: Berczi I and Kovacs K (eds). Hormones and Immunity. 20–37.

Murphy. BEP., Dhar. V., Ghadirian. AM., Chouinard. G and Keller R. 1991. Response to steroid suppression in major depression resistant to antidepressant therapy. *J. Clin. Psychopharmacol.* 11: 121-126.

Murphy, BEP. 1997. Antigluccorticoid therapies in major depression: a review. *Psychoneuroendocrinology* .22: 125- S132.

Murphy. B.E.P., Ghadirian. A.M. and Dhar V. 1998. Neuroendocrine responses to inhibitors of steroid biosynthesis in patients with major depression resistant to antidepressant therapy. *Can. J. Psychiatry.* 43: 279-286.

NicDhonnchadha. BA., Bourin. M. and Hascoët. M. 2003. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res.* 140:203-214.

Nussenblatt RB. 1987. Basic and clinical immunology in uveitis. *Jpn J Ophthalmol.* 31(3):368-74.

Osman. MM., Lulic. D., Glover. L., Stahl. CE., Lau. T., Van Loveren. H. and Borlongan CV. 2011. Cyclosporine8A as a neuroprotective agent against stroke: its translation from laboratory research to clinical application. *Neuropeptides.* 45(6):359868.

Pellow. CP., File. SE. and Briley. M., 1985. Validation of open : closed arm entries in Elevated plus maze as a measures of anxiety in the rat. *J. Neurosci Methods.* 14 :149.

Pierard C, Liscia P, Valleau M, Drouet I, Chauveau F, Huart B, et al. 2006. Modafinil-induced modulation of working memory and plasma corticosterone in chronically-stressed mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 83:1-8.

Pitsavos C, Panagiotakos DB, Papageorgiou C, Tsetsekou E, Soldatos C, Stefanadis C. 2006. Anxiety in relation to inflammation and coagulation markers, among healthy adults: the ATTICA study. *Atherosclerosis.* 185(2):320-6.

Porsolt R.D., LePichon M., Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*; 266, 730-732.

Porsolt. RD., Anton. G., Blavet. N. and Jalfre. M. 1978. Behavioral despair in rats : A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur.J. Pharmacol.* 47, 379-391.

Porsolt. RD., Bertin. AG., Blavet. N., Deniel. M. and Jalfre M. 1979. Immobility induced by the FST in rodents : effects of agents which modify central catecholamines and serotonergic activity. *Eur. J. Pharm.* 57: 201-210.

Rabin. D., Gold. P.W., and Margioris. A. 1988. Stress and reproduction: Interactions between the stress and reproductive axis. In: Chrousos GP, Loriaux DL, Gold PW (eds) *Mechanisms of physical and emotional stress.* Plenum Press New York. 377-390.

Rebuffat. P., Cavallini. L., Belloni. AS., Mazzocchi. G., Coi. A., de Tos. GP., and Nussdorfer. GG. 1989. A morphometric study on the reversal of ACTH-induced hypertrophy of rat adrenocortical cells after cessation of treatment, *J Submicrosc Cytol Pathol*, 21: 73-81.

Rajfer, C., Sikka, SC., Lemmi, C., and Koyle, MA. 1987. Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinology* . 121(2): 586-9.

Reneric. J.P. and Lucki I. 1998. Antidepressant behavioral effects by dual inhibition of monoamine reuptake in the rat forced swimming test. *Psychopharmacology* .136: 190–197

Rex. A., Schickert. R. and Fink H. 2004. Antidepressant-like effect of nicotinamide adenine dinucleotide in the forced swimming test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 77: 303- 307.

Rezzani R. 2004. Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem.* 39:85-128.

Rezzani R. 2006. Exploring cyclosporine A-side effects and the protective role-played by antioxidants: the morphological and immunohistochemical

studies. *Histol Histopathol.* 21:301-16.

Rivier. C., Rivier. J. and Vale W. 1986. Stress-induced inhibition of reproductive function: Role of endogenous corticotropin releasing factor. *Science* .231:607-609

Rivier. C., And Rivest S. 1991. Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: Peripheral and central mechanisms. *Biol. Reprod.* 45:523-532.

Rodgers. RJ. and Johnson NJ. 1995. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures, in the murine elevated plus-maze test of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 52: 297-303.

Rouge´-Pont F., Mayo W., Marinelli, M., Gingras M., Le Moal M., and Piazza P.V. 2002. The neurosteroid allopregnanolone increases dopamine release and dopaminergic response to morphine in the rat nucleus accumbens. *Eur. J. Neurosci.* 16:169- 173.

Romeo. E., Strfhle. A., Spalletta. G., Di Michele. F., Hermann. B., Holsboer. F. and Pasini A. 1998. Rupperecht, R. Effects of antidepressant treatment on neuroactive steroids in major depression. *Am. J. Psychiatr.*155: 910-913.

Rupperecht. R., Strfhle. A., Hermann. B., Di Michele. F., Spalletta. G., Pasini. A., Holsboer. F. And Romeo E. 1998. Neuroactive steroid concentrations following metyrapone administration in depressed patients and healthy volunteers. *Biol. Psychiatry.* 44: 912-914.

Sakic, B., Szechtman, H., Talangbayan, H., Denburg, SD., Carbotte, RM., and Denburg, JA. 1994. Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. *Physiol. Behav.* 56: 609 -617.

Santen R.J., Bossche H.V., Synons J., .Brug;Ans J., de Coster R. 1983. Site of action of low dose ketoconazole on androgen biosynthesis in. *J. Clin. Endocrinology Metabol.* .57:732-736.

Sato, Y., Takayanagi, Y., Onaka, T., and Kobayashi. E. 2007. Impact of cyclosporine upon emotional and social behavior in mice, *Transplantation*. 83:1365-1370.

Saito. S., Okada. A., Ouwa. T., Kato. A., Akagi. M., and Kamei. C. 2010. Interaction between hippocampal gamma-aminobutyric acid (A) and N-methyl-D-aspartate receptors in the retention of spatial working memory in rats. *Biol Pharm Bull*. 33(3):439843.

Seethalakshmi. L., Menon. M., Malhotra. RK., and Diamond. DA. 1987. Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. *J Urol* .138: 991-5.

Seethalakshmi. L., Flores. C., Khauli. RB., Diamond. DA., and Menon M. 1990. Evaluation of the effect of experimental cyclosporine toxicity on male reproduction and renal function. Reversal by concomitant human chorionic gonadotropin administration. *Transplantation*; 49:17-9.

Seethalakshmi. L., Flores. C., Diamond. DA., and Menon M. 1990a. Reversal of the toxic effects of cyclosporine on male reproduction and kidney function of rats by simultaneous administration of hCG + FSH. *J Urol*. 144:1489-92.

Schrott, LM., and Crnic, LS. 1996. Increased anxiety behaviors in autoimmune mice. *Behavioral Neuroscience*. 110(3): 492-502.

Sikka. SC., Bhasin. S., Coy. DC., Koyle. MA., Swerdloff. RS., and Rajfer. J. 1988a. Effects of cyclosporine on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat: mechanism of action. *Endocrinology*.123:1069-74.

Sikka. SC., Coy. DC., Lemmi. CA., and Rajfer J. 1988b. Effect of cyclosporine on steroidogenesis in rat Leydig cells. *Transplantation* . 46:886-90.

Sikka. SC., Koyle. MA., Swerdloff. RS., and Rajfer. J. 1988. Reversibility of cyclosporine induced hypoandrogenism in rats. *Transplantation*.45: 784-7.

Simen. B.B., Duman. C.H., Simen. A.A., and Duman. R.S., 2006. TNF- α signaling in depression and anxiety: behavioral consequences of individual receptor targeting. *Biol. Psychiatry* 59:775-785.

Sloane JP, Lwin KY. Gore ME et al. 1985. Disturbance of blood brain barrier after bone marrow transplantation. *Lancet*. 2: 280.

Sirinivas. M., Agarwala. S., Datta Gupta. S., Das. SN., Jha. P., Misro. MM., and Mitra. DK. 1998 . Effect of cyclosporine on fertility in male rats. *Pediatr Surg Int* .13(5-6):388–91.

Smith R.S. 1991. The macrophage theory of depression. *Med. Hypotheses*. 35: 298–306

Sonino N. 1987 .The use of ketoconazole as an inhibitor of steroid production. *N. Engl. J. Med*. 317:812- 818.

Stephan, BC., Douglas, EL., and Diane, HR. 1984. Rapid elevation of serum prolactin concentrations by cyclosporine, a novel immunosuppressive drug. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 12 : 614-618.

Sullivan. PG., Sebastian. AH., and Hall. ED. 2011. Therapeutic window analysis of the neuroprotective effects of cyclosporine A after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 28(2):311-8.

Tecoma. E.S. and Huey. L.Y. 1985. Psychic distress and immune response. *Life Sci*. 36:1700-1712.

Trachtenberg, J., Halpern, N., and Pont, A. 1983. Ketoconazole: A novel and rapid treatment for advanced prostatic cancer. *J. Urol*. 130, 152–153.

Tsigos. C., Papanicolaou. DA., Kyrou. I., Raptis. SA., and Chrousos. GP. 1999. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J. Interferon Cytokine Res*. 19:1271-1276.

Türk. G., Ateşşahin. A., Sönmez. M., Yüce. A., and Çeribaşı. AO. 2007. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology*. 67:778-85.

Utsuyama M., Hirokawa K. 1989. Hypertrophy of the thymus and restoration of immune functions in mice rats by gonadectomy. *Mech. Ageing Dev.* 47:175-185.

Utsuyama M., Hirokawa K., Mancini C., Brunelli R., Leter G., Doria G. 1995. Differential effects of gonadectomy on thymic stromal cells in promoting T cell differentiation in mice. *Mech. Ageing Dev.* 81:107-117.

Uzunova. V., Sheline. Y., Davis. JM., Rasmusson. A., Uzunov. DP., Costa. E., and Guidotti A. 1998. Increase in the cerebrospinal fluid content of neurosteroids in patients with unipolar major depression who are receiving fluoxetine or fluvoxamine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 3239- 3244.

Veldhuis. HD., De Korte. CC., and De Kloet. ER. 1985. Glucocorticoids facilitate the retention of acquired immobility during forced swimming. *Eur. J. Pharmacol.* 115 (2-3): 211-7.

Von Horsten. S., Michael. S., Joche. V., Marc. S., Eckard. N., Rinhold. ES., Jurjen. W., and Manfred. S. 1998. Cyclosporine A Affects Open Behavior in DA Rats .*Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 60:71-76.

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

Weiss. SM., Wadsworth. G., Fletcher. A., and Dourish. CT. 1998. Utility of ethological analysis to overcome locomotor confounds in elevated maze models of anxiety. *Neurosci Biobehav Rev.* 23: 265-271.

White, DJ. 1982. Cyclosporine A. Clinical pharmacology and therapeutic potential. *Drugs.* 24(4): 322-34.

Whooley, M.A., Caska, C.M., Hendrickson, B.E., Rourke, M.A., Ho, J., and Ali, S., 2007. Depression and inflammation in patients with coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study. *Biol. Psychiatry.* 624: 314-320.

Wilson. M., and Biscardi. R. 1997. Influence of gender and brain region on neurosteroid modulation of GABA responses in rats. *Life Sci.* 60: 1679-1691.

Wolkowitz. OM., Reus. VI., Manfredi. F., Ingbar. J., Brizendine. L., and Weingartner. H. 1993. Ketoconazole administration in hypercortisolaemic patients. *Am. J. Psychiatry.* 150:810-812.

Wu. TH., and Lin. CH. 2008. IL-6 mediated alterations on immobile behaviour of rats in the forced swim test via ERK1/2 activation in specific brain region. *Behav. Brain. Res.;* 193 (2):183-91.

Xu. LG., Xu. HM., Zhang. JR., Song. QZ., Qi. XP., and Wang. XH. 2003. Effects of different dosages of cyclosporine A on the semen parameters of renal transplant patients. *Zhonghua Nan Ke Xu.* 9(9):679-80, 683.

Yamada. K., Iida. R., Miyamoto. Y., Saito. K., Sekikawa. K., Seishima. M. and Nebeshima. T. 2000. Neurobehavioral alterations in mice with targeted deletion of the tumor necrosis factor- α gene: implications for emotional behaviour. *J. Neuroimmunol.*111 (1-2):131-8.

Yang CH, Huang CC, and Hsu KS . 2005. Behavioral stress enhances hippocampal CA1 long-term depression through the blockade of the glutamate uptake. *J Neurosci* .25:4288-4293.

Yoshinoya. S., Yamamoto. K., Mitamura. T., Takeuchi. A., Takahashi. K., and Miyamoto T. 1988. Successful treatment of rheumatoid arthritis with low dose cyclosporine A. *Transplant Proc.* 20:243-7.

Yüce. A., Ateşşahin. A., and Çeribaşı. AO. 2008. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*103:186-91.

Zenke G, Strittmatter U, Fuchs S, Quesniaux VF, Brinkmann V, Schuler W, Zurini M, Enz A, Billich A, Sanglier JJ, and Fehr T. 2001 Sanglifehrins, a novel cyclophilin-binding compound showing immunosuppressive activity with a new mechanism of action. *J Immunol* 166:7165-7171.

Zhang. LH and Liu JO. 2001. Sanglifehrins, a novel cyclophilin-binding immunosuppressant, inhibits IL-2-dependent T cell proliferation at the G1 phase of the cell cycle. *J Immunol* .166:5611-5618.

Zorilla. EP., Luborsky. L., and McKAY. JR. 2001. The relationship of depression and stressors to immunological assays:a meta-analytic review. Brain. Behav. Immun. 15: 199-226.