

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة باجي مختار – عنابة

UNIVERSITE BADJI-MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION D'UN DIPLOME DE

DOCTORAT 3^{EME} CYCLE EN BIOLOGIE ANIMALE

Option: NEUROSCIENCE

Intitulé

**Étude des perturbations cognitivo -comportementales
Et physiologiques chez le rat mâle Wistar stressé et traité par
des antioxydants (Polyphenon et BCG).**

Présentée par : M^{me}. FRAIA Asma

Devant le jury :

M^r OUALI Kheireddine

Président

Pr. Université d'Annaba

M^r ACHOU Mohamed

Examineur

Pr. Université d'Annaba

M^r BOUDAH Abdennacer

Examineur

MCA. Université de Constantine

M^r DJENIDI Redha

Examineur

MCA. Université de Bordj Bou Arréridj

M^r FRIH Hacène

Directeur de Thèse

Pr. Université d'Annaba

Année universitaire 2015 / 2016

REMERCIEMENTS

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

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

*Je tiens à remercier très vivement **Monsieur le Professeur Kheïreddine Ouali** qui nous a fait l'honneur de présider le jury.*

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

*Je remercie très vivement **Monsieur le Professeur Abdennacer BOUDAÏ** qui a accepté de faire partie du jury et d'apporter ses critiques constructives.*

*Je tiens aussi à remercier **Monsieur le Maître de conférences Rédha DJENIDI** d'avoir bien voulu évaluer ce travail et de participer au jury de ma soutenance de thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude et de l'estime que je lui porte.*

*J'adresse mes plus sincères remerciements également à **Monsieur le Professeur Hacène FRIH** qui m'a aidé à la réalisation de ce travail par ses précieux conseils, son soutien moral et ses qualités humaines. Je le remercie pour son encadrement, sa grande disponibilité, ses encouragements et de m'avoir conseillé et fait partager ses connaissances. Il m'a initié à la recherche et m'a inculqué un savoir-faire inestimable...Aussi pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de la thèse. Je tiens ici à vous exprimer toute ma gratitude et vous dire que j'ai beaucoup appris et j'ai pris confiance en moi à vos côtés, je vous dis merci d'avoir été si patient et compréhensif pendant la rédaction. Son esprit de synthèse et son érudition restent pour moi l'exemple à suivre.*

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements aux : Pr N. Bouzorna, Pr O. Daas et Pr L. Boughdiri pour leurs encouragements et leur sympathie durant la réalisation de la thèse.

Un merci infini à tous mes collègues du Laboratoire de neuroendocrinologie appliquée : Guedri K., Latreche A., Haloui M., Faci H. , Taya H., Zouiche S. et Bencaci L. pour leurs encouragements et leur sympathie.

DEDICACES

Je dédie ce travail et ma profonde gratitude

À

Mes parents, pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué; avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consentis à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance, et sans qui je ne serais ce que je suis aujourd'hui.

À

*Ma sœur Sara qui est la joie, le sourire, mon frère Seif source d'inspiration et de courage et particulièrement, Riad, source d'espoir, mon aide la plus précieuse
Je dédie également, ce travail à ma belle-mère pour ses encouragements et ses conseils durant la réalisation de ma thèse.*

Mon affection et ma profonde reconnaissance sont adressées a mon très cher mari, mon « lab-mate » et mon support qui m'a accompagné tous au long de mon parcours, Mohamed Yacine Belkahlá. Je te dis simplement Merci, pour ton aide précieuse durant la réalisation de l'étude au laboratoire et la rédaction de la thèse.

Enfin je dédie ce travail à mon petit bébé Adam, mon chouchou, la lumière de ma vie, qui m'a redonné confiance en moi et surtout m'a prouvé que la vie est belle !!

Liste des Figures

Numéro des Figures	Titre	Pages
Figure I.1	Orientation des réponses neuroendocriniennes à l'agression suivant le comportement adopté en face d'une situation	24
Figure I.2	Représentation schématique des composants principaux du système limbique (amygdale, bulbe olfactif, hippocampe, septum, corps mamillaire...)	25
Figure I.3	Mécanismes d'activation de l'axe du stress par les facteurs cognitifs	32
Figure I.4	Mécanismes d'activation de l'axe du stress par les facteurs non cognitifs	34
Figure II.1	Protocole expérimental	48
Figure II.2	Effet du CMS et CMS + Poly E sur le comportement du type dépressif au test de la nage forcée (A: Piscine temps, B: Escalade temps, C: Temps d'immobilité). L'analyse de la variance et le test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les groupes l'un à l'autre (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	53
Figure II.3	Effets du CMS et CMS + Poly E sur le comportement de type anxiété au test labyrinthe en croix surélevé (A: Temps passé dans les bras ouverts ("s"), B: Nombre d'entrées dans les bras ouverts, C: Temps d'immobilité ("s")). L'analyse de la variance a été utilisée pour comparer les différents groupes, et le test de Benferroni de comparaison multiple ont servi pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	55
Figure II.4	Évolution temporelle du poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + Poly E. Le traitement par l'ANOVA à 2 facteurs (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les traitements (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	57
Figure II.5	Effets du CMS et le Poly E sur l'apport alimentaire (g / 100 g de poids corporel) mesuré dans CMS et CMS + Poly E. Le traitement par l'ANOVA (X jours) et post-test Benferroni ont été utilisés pour comparer chaque colonne (traitements) à toutes les autres colonnes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	59
Figure II.6	Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans les groupes de la CMS et Poly E. Deux voies de traitement par l'ANOVA X jours. Le post-test de Benferroni a été utilisé pour comparer les moyennes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	62
Figure II.7	Variation du poids relatif des organes (g / 100g de poids corporel) (A: surrénales, C: Cerveau, D: Testicules) et du niveau de testostérone (ng / ml) (B) chez les animaux soumis au CMS et CMS+PolyE. L'analyse de la variance et le test post hoc, test de multiple comparaison de Newman-Keuls ont été utilisés (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	64
Figure III.1	Protocole expérimental	78
Figure III.2	Effet du CMS et CMS + BCG sur le comportement du type dépressif au test de la nage forcée (A: Temps de nage, B: Temps d'escalad, C: Temps d'immobilité). L'analyse de la variance et le test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les groupes l'un à l'autre (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	81
Figure III.3	Effets du CMS et CMS + BCG sur le comportement de type anxiété au test de labyrinthe en croix surélevé (A: Temps passé dans les bras ouverts ("s"), B: Nombre d'entrées dans les bras ouverts, C: Temps d'immobilité ("s"). L'analyse	83

	de la variance a été utilisée pour comparer les différents groupes suivi du test de Benferroni de comparaison multiple pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).	
Figure II.4	Évolution temporelle du gain de poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + BCG. Le traitement par l'ANOVA à 2 facteurs (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les traitements (* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	85
Figure III.5	Effets du CMS et du BCG sur l'apport alimentaire (g / 100 g de poids corporel) mesurées dans CMS et CMS + BCG. Le traitement par l'ANOVA (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer chaque colonne (traitements) à toutes les autres colonnes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	87
Figure III.6	Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans les groupes CMS et BCG. Deux voies de traitement ANOVA X jours et post-test de Benferroni ont été utilisés pour la comparaison (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).	90
Figure III.7	Variation du poids relatif des organes (g / 100g de poids corporel) (A: Surrénales, C: Cerveau, D: Testicules) et du niveau de testostérone (ng / ml) (B) chez les animaux soumis au CMS et CMS+BCG. L'analyse de la variance et le test post hoc test de multiple comparaison de Newman-Keuls ont été utilisés (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	92
Figure IV.1	Protocole expérimental.	105
Figure IV.2	Paramètres de la nage forcée chez les rats mâles et femelles ligaturés et non ligaturés. (A: Temps de nage, B: Temps d'immobilité, C: Temps d'escalade).	111
Figure IV.3	Labyrinthe surélevé (EPM). Les paramètres du test chez les rats mâles et femelles ligaturés et non ligaturés (A: Temps passé dans les bras ouverts, B: Temps passé dans les bras fermés, C: Temps passé dans le centre de le dispositif).	113
Figure IV.4	Consommation de saccharose chez les rats mâles et les femelles qui ont subi ou non la ligature du nerf sciatique.	115
Figure V.1	Protocole expérimental.	126
Figure V.2	Effet de l'injection de l'IFA et de la ligature sur les paramètres du test de la nage forcée chez les rats Wistar. L'analyse de la variance, le test de Newman-Keuls et le <i>post hoc</i> test de comparaison multiple ont été utilisés pour comparer chaque groupe à l'autre. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).	132
Figure V.3	Variation du niveau de la testostérone (ng / ml) (A) et de l'oestradiol (ng / ml) (B) chez les rats témoins, traités avec l'AIF et ligaturés. L'analyse de la variance et le Newman-Keuls test et le <i>post hoc</i> test de comparaison multiple ont été utilisés pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).	134
Figure VI.1	Protocole expérimental	148
Figure VI.2	Evolution des paramètres du test de la nage forcée: Temps d'immobilité (A) (sec), Temps de nage (sec) (B) et Temps d'escalade (sec) (C), chez le groupe contrôle et les groupes LIG et LIG + BCG (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	150
Figure VI.3	Variation des taux de testostérone (ng / ml) et d'oestradiol (ng / ml) chez le groupe contrôle et les groupes LIG LIG + BCG (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).	152

Liste des Tableaux

Numéro des Tableaux	Titre	Pages
Tableau II.1	Programme du Stress chronique imprédictible (CMS) appliqué.	45
Tableau II.2	Test de comparaison multiple de Bonferroni. Apport de saccharose (%) dans les groupes de la CMS et Poly E (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).	61
Tableau III.1	Programme du stress chronique imprédictible (CMS) appliqué.	76
Tableau III.2	Test de comparaison multiple de Bonferroni. Apport de saccharose (%) dans les groupes CMS et BCG (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).	89

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	16
Chapitre I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES.....	20
I. 1. Définitions et physiologie du stress	20
I.1. 1. Définitions	20
I.1.1.1. Stress.....	20
I.1.1.2. Stress aigu et stress chronique	21
I.1.1.3. Stress cognitif et stress non cognitif	21
I.1.1.4. Stress biologique et stress psychique	22
I.2. Physiologie du stress	22
I.2.1. Réponse au stress (Syndrome Général d'Adaptation (SGA)).	23
I.2.1.1. La phase d'alarme.....	26
I.2.1.2. La phase de résistance.....	27
I.2.1.3. La phase d'épuisement.....	27
I.3. Neuroimmunologie du stress : Interactions entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire.	29
I.3.1. Principales composantes du système immunitaire.....	29
I.3.2. Mécanismes d'activation de l'axe du stress.....	31
I.3.2.1. Mécanismes d'activation par les facteurs cognitifs (Figure I.3)	31
I.3.2.2. Mécanismes d'activation par les facteurs non cognitifs (Figure I.4)	33
I.4. Stress et pathologies psychiatriques	35
I.4. 1. Stress et anxiété	35
I.4. 2. Stress et dépression	37

**Chapitre II- Etude des effets du polyphénol E chez un modèle animal de dépression:
Le stress chronique imprédictible (*Chronic Mild Stress*) chez le rat mâle Wistar. ..39**

II.1. INTRODUCTION	42
II.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
II.2.1. Animaux d'expérience	44
II.2.2.2. Mesure de la consommation d'aliment.....	46
II.2.3. Test de préférence sucrée (anhédonie).....	46
II.2.4. Application du stress chronique (CMS)	47
II.2.5. Administration du Polyphénol E.....	47
II.2.6. Gain de poids corporel	47
II.2.7. Etude comportementale	49
II.2.7.1. Test du labyrinthe surélevé.....	49
II.2.7.2. Test de la nage forcée.....	49
II.2.8. Collecte des organes et des échantillons sanguins.....	49
II.2.9. Dosage de la testostérone par méthode ELISA	50
II.2.10. Analyse statistique des résultats.....	51
II.3. RÉSULTATS	52
II.3.1. Effet de la CMS et CMS + Poly E sur le comportement dépressif-like (Nage forcée).....	52
II.3. 2. Effets comportementaux de type anxieux du CMS et CMS + Poly E dans le test du labyrinthe en croix surélevée	54
II.3.3. Évolution temporelle du gain du poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + Poly E	56
II.3.4. Évolution temporelle de la prise alimentaire (g / 100 g de poids corporel) chez les groupes CMS et Poly E.....	58
II.3.5. Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans le CMS et CMS + PolyE.....	60
II.3.6. Variations des niveaux de la testostérone chez les rats soumis au CMS et CMS + Poly E.	63

II.3.7. Variations du poids relatif des organes (cerveau, testicules et surrénales) chez les rats soumis au CMS et CMS + Poly E.	63
II.4. DISCUSSION	65
CONCLUSION.....	70

Chapitre III- Etude des effets du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) chez un modèle animal de dépression: Le stress chronique imprédictible (<i>Chronic Mild Stress</i>) chez le rat mâle Wistar.	71
---	----

III.1. Introduction	74
III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
III.2.1. Animaux d'expérience	75
III.2.2. Mesure de la consommation d'aliment.....	77
III.2.3. Test de préférence sucrée (anhédonie).....	77
III.2.4. Application du stress chronique (CMS)	77
III.2.5. Administration du BCG.....	77
III.2.6. Gain de poids corporel	77
III.2.7. Etude comportementale	79
III.2.7.1. Test du en croix labyrinthe surélevé	79
III.2.7.2. Test de la nage forcée.....	79
III.2.8. Collecte des organes et des échantillons sanguins.....	79
III.2.9. Dosage de la testostérone par la méthode ELISA	79
III.2.10. Analyse statistique des résultats.....	79
III.3. RÉSULTATS	80
III.3.1. Effet du CMS et CMS +BCG sur le comportement dépressif-like (Nage forcée)	80
III.3. 2. Effets comportementaux de type anxieux du CMS et CMS + BCG dans le test du labyrinthe en croix surélevée	82

III.3.3. Évolution temporelle du gain de poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS +BCG:	84
III.3.4. Évolution temporelle de la prise alimentaire (g / 100 g de poids corporel) chez les groupes CMS et BCG.....	86
III.3.5. Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans le CMS et CMS+ BCG.....	88
III.3.6. Variation des niveaux de testostérone (ng/ml) chez les animaux soumis au CMS et traités au BCG.....	91
III.3.7. Variation du poids relatif des organes (ceveau, testicule et surrénales) (g) chez les animaux soumis au CMS et traités au BCG.	91
III.4. DISCUSSION.....	93

Chapitre IV- Étude comparative des effets du traitement au BCG chez des rats mâles et femelles Wistar ayant subi la ligature du nerf sciatique	98
--	----

IV.1. INTRODUCTION	101
IV.2.MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	104
IV.2.1. Matériel biologique	104
IV.2.2. Modèle animal :.....	104
IV.2.3. Ligature du nerf sciatique « <i>sciatic nerve injury</i> »	104
1. Lotissement des rats	105
2. Ligature du nerf sciatique	105
3. Test de mesure de la dépression	105
IV.2.4. Protocole expérimental	106
IV.2.4.1. Anesthésie	106
IV.2.4.2. Chirurgie.....	106
IV.2.4.3. Période post-chirurgie.....	107
IV.2.5. Méthodes :	107
IV.2.5.1. Test de labyrinthe surélevé.....	107

IV.2.5.2. procédure de la nage forcée (<i>Forced Swimming Test</i>)	107
IV.2.5.3. Test de préférence sucrée	107
IV.2.6. L'analyse statistique des résultats	108
IV.3. RESULTATS :	109
IV.3.1. Variation des paramètres du test de la nage forcée (<i>Forced Swimming test</i>) :	109
IV.3.2. Variation des paramètres de plus mase test	112
IV.3.3. Variation de la préférence au saccharose.....	114
IV.4. DISCUSSION	116
IV.5. CONCLUSION	119

Chapitre V- Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité à l'adjuvant incomplet de freund (AIF).....	120
--	-----

V.1. INTRODUCTION	123
V.2. MATERIEL ET METHODES :	125
V.2.1. Matériel biologique :	125
V.2.2. Ligature du nerf sciatique « <i>sciatic nerve injury</i> »	125
V.2.4. Méthodes :	127
V.2.4.1. Traitement par l'AIF (Adjuvant Incomplet de Freund) :	127
V.2.5. Étude comportementale : procédure de la nage forcée (<i>Forced Swimming Test</i>).....	127
V.2.6. Collecte des organes et des échantillons sanguins	127
V.2.7. Dosage de la testostéronémie et d'oestradiolémie par la méthode ECLIA ...	127
V.2.7.1. Dosage de la testostérone plasmatique par la méthode ECLIA	127
V.2.7.1. Dosage de l'œstradiol plasmatique par la méthode ECLIA	129
V.2.8. Analyse statistique des résultats	130
V.3. RESULTATS	131

V.3.1. Effet de la ligature et de l'AIF sur le comportement <i>dépressif-like</i> au test de la nage forcée.....	131
V.3.2. Effets de la ligature et de l'AIF sur les paramètres biochimiques.....	133
V. 3.2.1. Variation du niveau de testostérone plasmatique (ng/ml)	133
V.4. DISCUSSION	135
V.5. CONCLUSION	139

Chapitre VI- Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité au BCG.140

VI.1. INTRODUCTION	143
VI.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	145
VI.2.1. Matériel biologique	145
VI.2.2. Ligature du nerf sciatique « <i>sciatic nerve injury</i> »	145
VI.2.4. Méthodes.....	146
VI.2.4.1. Application des traitements	146
VI.2.4.1.1. Traitements au Bacille Calmette Guérin (BCG)	146
VI.2.4.1.2. Traitement par la cyclosporine (CsA).....	146
VI.2.5. Étude comportementale : procédure de la nage forcée (<i>Forced Swimming Test</i>)	147
VI.2.6. Collecte des organes et des échantillons sanguins	147
VI.2.7. Dosage de la testostéronémie et d'oestradiolémie par la méthode ECLIA ..	147
VI.2.8. Analyse statistique des résultats	147
VI.3. RÉSULTATS.....	149
VI.3.1. Résultats du traitement statistique des variations du temps d'immobilité, nage et escalade chez les rats contrôles, ligaturés et traités au BCG	149
VI.3.4. Taux de testostérone et d'oestradiol chez les rats contrôles, ligaturés et traités	151

VI.4. DISCUSSION	153
VI.5. CONCLUSION	155
CONCLUSION GENERALE	156
REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES.....	158

RESUME GENERAL

La dépression est une pathologie multifactorielle dont la symptomatologie est associée à des perturbations biologiques telles qu'une activation de l'axe HPA, des modifications neuroblastiques, des concentrations élevées en cytokines pro-inflammatoires au niveau périphérique et central. D'autres systèmes physiologiques semblent également être impliqués de façon importante dans la physiopathologie des troubles dépressifs.

Il existe de nombreux modèles animaux de pathologies humaines dont certains permettent d'étudier l'étiologie et la physiopathologie des troubles alors que d'autres sont plutôt destinés à évaluer l'efficacité des traitements. Ces modèles doivent remplir certains critères de validité. En ce qui concerne les troubles dépressifs, il ne peut exister de modèle idéal compte tenu de l'importante part subjective des symptômes. Le stress constituant un des principaux facteurs précipitant l'apparition des troubles, il semble que les modèles basés sur l'exposition récurrente à des stressseurs soient les plus adaptés à l'étude et à la compréhension des altérations bio-comportementales sous-jacentes aux troubles dépressifs.

Dans la présente étude nous avons utilisé deux modèles de depression: le premier est le stress chronique imprédictible ou *chronic mild stress* (CMS) Le paradigme (CMS) est constitué de plusieurs facteurs des stress légers qui sont analogues à ceux rencontrés chez les humains. Le deuxième modèle tend à provoquer une douleur neuropathique par la ligature du nerf sciatique.

Dans la cette thèse nous avons en premier lieu abordé quelques notions bibliographiques de base sur les interactions entre le système nerveux, le système endocrinien et le système immunitaire suite à la réponse au stress qui fait intervenir un ensemble de mécanismes physiologiques. (Chapitre 1). Dans le chapitre 2, nous avons opté pour une démarche expérimentale basé sur l'effet antioxydant d'un flavonoïde le Polyphenon E chez des rats soumis au CMS. Apres avoir démontré la validité du CMS, nous avons testé l'effet d'un agent immunogène le BCG (chapitre 3). Dans le chapitre 4 nous avons fait une étude comparative sur les conséquences des effets du traitement au BCG chez des rats mâles et femelles Wistar ayant subi la ligature du nerf sciatique. Le 5eme et 6eme chapitres abordent les variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique de rat mâle Wistar traité à l'AIF (chapitre 5) et au BCG (chapitre 6).

Les changements comportementaux sont estimés à travers la mesure de la dépression au test de la nage forcée et de l'anxiété au test du labyrinthe en croix surélevée. Le test de préférence sucrée (anhédonie) et la consommation d'aliment sont également évalués. Au

terme de l'expérimentation, la testostérone plasmatique et les poids relatives des organes (Cerveau, surrénales et testicules) sont mesurés.

Nos résultats montre :

- Le CMS génère la dépression et l'anxiété chez l'animal et diminue la consommation d'eau sucrée et de l'aliment (Chapitre 2).
- Diminue les niveaux de testostérone chez le lot CMS (Chapitre 2) et augmente le poids relatif des testicules (Chapitre 2).
- Le Poly E1 (5g/"L") exerce son effet anxiolytique et antidépresseur chez le lot CMS (Chapitre 2).
- Le CMS génère la dépression et l'anxiété chez l'animal, au test de la nage forcée et au labyrinthe en croix surélevée (Chapitre 3).
- Diminution de la consommation d'eau sucrée et de l'aliment chez les rats CMS (Chapitre 3).
- Le BCG exerce un effet dépressinogènes-*like* lorsqu'il est administré seul (Chapitre3)
- Le BCG exerce un effet réparateur antidépresseur-*like* en association avec CMS (Chapitre 3)
- Augmentation significative de la dépression chez les rats mâles la ligature (Chapitre4)
- Augmentation de dépression chez les rates femelle contrôle par rapport au rat males contrôles (Chapitre 4).
- Diminution de la depression chez les femelles traitées par le BCG par rapport aux contrôles (Chapitre 4).
- Augmentation de la dépression 10 jours après ligature du nerf sciatique (Chapitre 5).
- Augmentation du temps d'immobilité au cours de la FST (Chapitre 5).
- Augmentation de la testostérone chez les sujets ligaturés et traités (AIF) (Chapitre 5) .
- Diminution significative de l'œstradiol (Chapitre 5).
- Pas d'effets sur la nage forcée après 10 et 20 jours post opératoires (Chapitre 6).
- Un effet antidépresseur chez les rats ligatures traités au bout de 30 jours (Chapitre 6)
- Augmente la testostérone et diminue l'œstradiol chez les rats traités au BCG (Chapitre6)
- Diminution de testostérone et une augmentation de l'œstradiol chez les rats traités au (CsA) (Chapitre 6).

GENERAL ABSTRACT

Depression is a multifactorial disease in which the symptoms are associated with biological disorders such as activation of the HPA axis, of neuroblastoma changes, high concentrations of pro-inflammatory cytokines in the central and peripheral levels. Other physiological systems appear to be significantly involved in the pathophysiology of depression. There are numerous animal models of human diseases, some are used to study the etiology and pathophysiology of the disorder while others are rather intended to evaluate the effectiveness of treatments. These models must meet certain criteria of validity. Regarding depressive disorders, there can not be an ideal model in view of the important part of the subjective symptoms. Stress constituting a major factor precipitating the onset of disorders, it seems that the models based on recurrent exposure to stressors are most suitable for the study and understanding of bio-behavioral alterations underlying depressive disorders. In this study we used two models the first depression is chronic stress or unpredictable chronic mild stress (CMS) Paradigm (CMS) consists of several factors mild stress were similar to those seen in humans. The second model tends to cause neuropathic pain by the sciatic nerve ligation.

All d`abords we illustrated light on bibliographic basics about the interactions between the nervous system, endocrine system and the immune system after the stress response that involves a set of physiological mechanisms. (Chapter 1). In (Chapter 2) we opted for an experimental approach bases on antioxidant effet flavonoid d`un the Polyphenon rats soumissent the CMS. After showing the validity of the CMS, we tested l`effet d`un immunogen BCG (Chapter 3), the 4th chapter tends studied the effects of BCG compared the effects of treatment in male rats and female Wistar have undergone sciatic nerve ligation. The 5th and 6th chapter is and involves changes in levels of testosterone and oestradiolémie male rat neuropathic model Wistar treated once an l`AIF (Chapter 5) and again at BCG (Chapter 6). The behavioral changes are estimated through measuring the depression in the forced swim test and the test of anxiety in an elevated cross labyrinth. Preferably the sweet test (anhedonia) and feed intake are also evaluated. At the end of the experiment, plasma testosterone and relative organ weights (brain, adrenal glands and testes) were measured.

Our results show:

- The CMS generates depression and anxiety in animals and reduces sugar water consumption and food (Chapter 2).

- Testosterone Decreases in the CMS lot (Chapter 2) and increase the relative weight of the testes (Chapter 2).
- Poly E1 (5g / "L") exerts its anxiolytic and antidepressant in the CMS lot (Chapter 2).
- The CMS generates depression and anxiety in animals, the swimming test strength and elevated cross labyrinth (Chapter 3).
- Decreased consumption of sweetened water and food in CMS rats (Chapter 3).
- BCG exerts dépressinogènes-like effect when administered alone (Chapter 3)
- BCG exerts a restorative effect antidepressant-like in association with CMS (Chapter 3)
- Significant increase of depression in male rats ligation (Chapter 4)
- Depression Increase in female rats compared to control rats male controls (Chapter 4).
- Decreased depression in females treated with BCG compared with controls (Chapter 4).
- Increase of 10 days post-surgery depression among subjects ligatures (Chapter 5).
- Increased immobility time in the FST (Chapter 5).
- Increased testosterone in subjects treated ligated (AIF) (Chapter 5).
- Significant reduction of estradiol (Chapter 5).
- No effects on the forced swimming after 10 and 20 days post surgery (Chapter 6).
- An antidepressant effect in rats treated ligatures after 30 days (Chapter 6)
- Increase testosterone and decrease of estradiol in rats treated with BCG (Chapter 6)
- Decreased testosterone and increased estradiol in rats treated with (CsA) (Chapter 6)

الاكتئاب هو مرض متعدد العوامل التي ترتبط الأعراض يعانون من اضطرابات بيولوجية مثل تفعيل محور HPA ، التغيرات العصبية، على تركيزات عالية من السيروتوكينات المولية للالتهابات في المستويات المركزية والمحيطية. ويبدو أن الأنظمة الفسيولوجية الأخرى التي ستشارك بشكل كبير في الفيزيولوجيا المرضية للاكتئاب.

هناك العديد من النماذج الحيوانية من الأمراض التي تصيب الإنسان، وتستخدم بعض لدراسة المسببات والفيزيولوجيا المرضية من اضطراب في حين أن البعض الآخر المقصود ليس لتقييم فعالية من العلاجات. يجب أن تكون هذه النماذج تلبية معايير معينة لصحتها. وفيما يتعلق اضطرابات اكتئابية، لا يمكن أن يكون هناك نموذج مثالي نظرا لجزء مهم من الأعراض الذاتية. الإجهاد يشكل عاملا رئيسيا عجل بظهور الاضطرابات، يبدو أن النماذج القائمة على التعرض المتكرر إلى الضغوطات هي الأكثر مناسبة لدراسة وفهم التغيرات البيولوجية الكامنة وراء الاضطرابات السلوكية للاكتئاب. في هذه الدراسة استخدمنا نموذجين للاكتئاب الأول هو الإجهاد المزمن أو غير متوقعة الإجهاد المزمن الخفيف (CMS) النموذج (CMS) ويتكون من عدة عوامل الإجهاد معتدل كانت مشابهة لتلك التي ظهرت في البشر. النموذج الثاني يميل إلى أن يسبب آلام الأعصاب التي ربط العصب الوركي.

جميع d'abords نحن المصور الضوء على أساسيات ببليوغرافية حول التفاعلات بين الجهاز العصبي، ونظام الغدد الصماء والجهاز المناعي بعد الاستجابة للضغط النفسي الذي ينطوي على مجموعة من الآليات الفسيولوجية). الفصل 1. (2) اخترنا لقواعد المنهج التجريبي على l'effet مضادات الأكسدة الفلافونويد d'un الفئران Polyphenon soumission CMS. بعد تبين صحة CMS ، اختبرنا l'effet BCG d'un مستمتع (الفصل 3)، الفصل 4 TH يميل دراسة آثار BCG مقارنة آثار العلاج في الفئران الذكور والإناث ويستار خضعوا ل الوركي ربط الأعصاب. و5 و6 TH الفصل وينطوي على تغيرات في مستويات هرمون تستوستيرون و oestradiolémie الفئران الذكور نموذج الأعصاب ويستار تعامل مرة واحدة في (AIF الفصل 5) ومرة أخرى في) BCG الفصل 6. وتقدر التغييرات السلوكية من خلال قياس الاكتئاب في اختبار السباحة القسري واختبار من القلق في مناهة عبر مرتفعة. وبفضل أن يتم تقييم أيضا اختبار الحلو (انعدام التلذذ) واستهلاك العلف. في نهاية التجربة، هرمون تستوستيرون البلازما والأوزان النسبية (الدماغ والغدد الكظرية والخصيتين) تم قياس.

وتشير نتائجنا.

- اتفاقية الأنواع المهاجرة يولد الاكتئاب والقلق في الحيوانات ويقلل من استهلاك الماء والسكر والأغذية (الفصل 2).
- يقلل من هرمون تستوستيرون في الكثير) CMS (الفصل 2) .
- زيادة الوزن النسبي للخصية (الفصل 2)
- بولي (E1 / "L" / 5G) يمارس مزيل القلق، ومضادات الاكتئاب في الكئي) CMS (الفصل 2) .
- اتفاقية الأنواع المهاجرة يولد الاكتئاب والقلق لدى الحيوانات، واختبار قوة السباحة ومناهة عبر مرتفعة (الفصل 3).
- انخفاض استهلاك المياه المحلاة والغذاء في الفئران CMS (الفصل 3) .
- يمارس BCG dépressinogènes مثل تأثير عندما تدار وحدها (الفصل 3)
- يمارس BCG تأثير التصالحية مثل مضادات الاكتئاب، بالتعاون مع CMS (الفصل 3)
- زيادة كبيرة الاكتئاب على الفئران الذكور ربط (الفصل 4)
- الكساد زيادة في إناث الفئران مقارنة للسيطرة على الفئران الضوابط الذكور (الفصل 4)
- الاكتئاب وانخفضت لدى الإناث تعامل مع BCG مقارنة مع الضوابط (الفصل 4)
- زيادة الاكتئاب 10 أيام بعد الجراحة بين موضوعات الحروف المركبة (الفصل 5)
- زيادة الوقت الجمود في FST (الفصل 5).
- زيادة هرمون تستوستيرون في المواضيع المعالجة) (AIF ligated (الفصل).
- انخفاض كبير في استراديول (الفصل 5) .
- أي آثار على السباحة القسري بعد 10 و 20 يوما بعد الجراحة (الفصل 6).
- إن تأثير مضاد للاكتئاب في الفئران المعالجة الأربطة بعد 30 يوما (الفصل 6)
- زيادة هرمون تستوستيرون واستراديول انخفاض في الفئران التي عرضت ل BCG (الفصل 6)
- انخفاض هرمون تستوستيرون واستراديول زيادة في الفئران التي عرضت ل (CSA) (الفصل 6)

INTRODUCTION GÉNÉRALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La dépression est une maladie dévastatrice et un contributeur majeur à la charge mondiale de morbidité (**Greden, 2001 ; Greenberg et al., 2005**). Le traitement des troubles dépressifs reste un défi, en dépit de la disponibilité de plusieurs classes d'antidépresseurs.

Le stress peut être défini comme un processus psycho-physiologique généralement ressenti comme un état émotionnel négatif (**Agarwal, 2001**), il active la réponse inflammatoire, comme la libération des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-1 (**Capuron et al., 2004 ; Dunn et al., 1999; Maier et al., 1998**). Ces cytokines pénètrent dans le cerveau *via* les régions qui fuient dans la barrière hémato-encéphalique, puis participent à des voies impliquées dans le développement de la dépression ; et parce que les cytokines activent l'axe corticotrope tout en altérant le bon fonctionnement des systèmes monoaminergiques, en particulier sérotoninergique, on a longtemps pensé, et l'on y pense encore, qu'il pourrait exister une relation de cause à effet entre cytokines et dépression (**You et al., 2011**).

De nombreuses études ont montré que le stress accélère l'apoptose des neurones et cause des modifications de la structure et la fonction de l'hippocampe chez les rongeurs, l'hippocampe étant le chemin commun de nombreux types d'antidépresseurs (**Kodama et al., 2004**). Le traitement de la dépression a été révolutionné il y a un demi-siècle environ avec l'introduction des antidépresseurs. Cet événement a marqué le début de l'ère moderne de la recherche sur la dépression, afin d'identifier ses bases neurobiologiques (**Nestler et al., 2002**).

A ses débuts, le concept de stress était limité à l'idée d'une suite de réactions biologiques. En raison des nombreuses théories, ce concept a évolué et les chercheurs ont tenté de le développer, pour devenir actuellement une notion plus large, interactive entre l'individu et son environnement (**Boudarene, 1997**). La réponse au stress comprend un volet comportemental qui permet à l'individu de contrôler son environnement et les mécanismes neuroendocriniens qui assurent le maintien de l'homéostasie. Ceux-ci sont étroitement dépendants de la nature et de l'intensité des activations neuroendocriniennes et des conséquences pathologiques qui sont très variables selon la situation et les possibilités de contrôle comportemental (**Dugovic et al., 1999**).

Les êtres humains sont exposés à différents genres de stress physique, chimique ou psychologique. Lorsque le stress est perçu, la réponse est coordonnée par le cerveau. L'évaluation cognitive d'une situation dans le cerveau interagit avec les signaux corporels de

la circulation sanguine comme les hormones, les molécules inflammatoires et l'information provenant des nerfs périphériques et rendent compte de l'état des organes vitaux et des sensations. Le cerveau intègre ces informations pour produire une série de réponses neuroendocrinologiques (**Peters, 1988-1990**).

L'exposition à un stress chronique est considérée comme un accélérateur ou un aggravateur de désordre neuropsychiatrique sévère, y compris la dépression (**Mazure, 1995**). L'hypothalamus, l'hippocampe et le cortex préfrontal sont impliqués directement dans la régulation du stress chronique (**Feldman et Weidenfeld, 1999 ; Kitraki et al., 1999**). En effet, l'hippocampe est une structure critique pour l'apprentissage et la mémoire spatiale. Il est particulièrement vulnérable aux stress, induisant des perturbations dans la régulation du métabolisme des glucocorticoïdes (**Maroun et Richter-Levin, 2003**). Au stress, répond la libération de CRF par l'hypothalamus, ce qui active l'hypophyse qui libère alors l'ACTH dans la circulation sanguine. L'ACTH stimule la production de glucocorticoïdes par le cortex surrénalien. Parallèlement, la médullo-surrénale libère de l'adrénaline et les terminaisons sympathiques de la noradrénaline (**De Boeck, 1994**). Le stress est le plus important modulateur de la sécrétion d'ACTH dont il peut en modifier le rythme. On pensait que le CRF pouvait seul réguler l'ACTH, mais en fait, les catécholamines et d'autres hormones sont également impliquées dans cette régulation (**Selye, 1976**). Le rôle des catécholamines dans l'immunosuppression consécutive au stress commence à être bien connu. Lors d'un stress physique ou psychologique particulièrement intense, il y a une activation du système nerveux sympathique qui libère de l'ADR et de la NADR dans la circulation sanguine. Le stress induit des réponses inflammatoires dans diverses régions du cerveau et déclenche la production des cytokines pro-inflammatoires et IL-1 β (**Blandino et al., 2009**). Certains éléments montrent que les cytokines inflammatoires administrées aux animaux de laboratoire induisent des symptômes dépressifs, y compris des déficits cognitifs, l'anhédonie et des troubles des activités locomotrices (**Godbout et al., 2008**).

Les cytokines et les messagers chimiques jouent un rôle crucial dans la médiation inflammatoire et les réponses immunitaires. Elles jouent également un rôle de médiateur de signalisation entre les cellules de tissus non immunisés, y compris le système nerveux (**Dantzer et al., 2008**). La libération de cytokines pro-inflammatoires contribue à la neurodégénérescence (**Wang et al., 2008**) et la recherche clinique a montré que chez des patients déprimés, la morphologie et la fonction de l'hippocampe sont modifiées. Ces modifications sont mises en évidence *in vivo* par des études réalisées par RMN (**Lucassen et**

al., 2010). La dépression est caractérisée par une augmentation des niveaux de cytokines pro-inflammatoires telles que le facteur de nécrose tumorale (TNF α) et l'IL-6, qui ont été étudiés dans le cas des patients déprimés (**Dowlati et al.**, 2010).

Le Chronic mild stress (CMS) qui a été décrit à l'origine par **Willner et al.** (1987), est un modèle de dépression obtenu par l'utilisation de facteurs de stress chroniques pendant 40 jours. Il consiste à exposer les animaux à une variété de stress comme l'isolement, la privation d'eau ou de nourriture. Le protocole est considéré comme étant proche de la situation humaine face aux tracasseries quotidiennes et à des événements traumatisants (**Willner et al.**, 2005).

De nombreux travaux semblent indiquer que les flavonoïdes possèdent des propriétés anti-inflammatoires (**Read**, 1995). Ils sont capables de moduler le fonctionnement du système immunitaire (**Middleton et Elliott**, 1996). Les flavonoïdes sont de puissants inhibiteurs de la prolifération des lymphocytes B et T. L'effet anti-prolifération des flavonoïdes pourrait s'expliquer par leur capacité d'inhiber l'activité de certaines protéines kinases (protéine kinase C ou protéine tyrosine kinase) (**Namgoong et al.**, 1994). De plus, elles sont susceptibles de diminuer la libération d'histamine des basophiles et des mastocytes (**Middleton et Drzewiecki**, 1984).

La présente étude vise à mettre en évidence les effets de deux modèles animaux de dépression. Le premier, le plus connu en psychiatrie expérimentale, est le stress chronique imprédictible ou *chronic mild stress* (CMS), le second est un nouveau modèle que les chercheurs tentent de développer ces derniers temps, il s'agit de la douleur neuropathique inflammatoire.

Dans cette perspective et considérant les multiples interactions psycho-neuro-immuno-endocriniennes, notre travail s'inscrit dans le cadre de l'étude de la physiopathologie et des pathologies psychiatriques liées au stress chronique psychologique.

Les objectifs principaux de notre travail sont :

1. Mise en évidence de l'activité Immuno-Cortico-Gonadotrope dans les deux modèles de dépression, en l'occurrence le CMS et la douleur neuropathique.
2. Connaître et évaluer les capacités adaptatives de l'organisme dans chaque modèle.
3. Cerner les interactions neuro-immuno-endocriniennes mises en jeu dans chaque situation (CMS et douleur neuropathique) et d'en expliquer les mécanismes régulateurs suite aux

différents traitements (par le polyphénol E qui est un antioxydant, le BCG, et l'adjuvant de Freund).

Notre thèse est scindée en six chapitres:

Le chapitre I: Rappels bibliographiques

Le chapitre II: Etude des effets du polyphénol E chez un modèle animal de dépression: le stress chronique imprédictible (*Chronic Mild Stress*) chez le rat mâle Wistar.

Le chapitre III: Etude des effets du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) chez un modèle animal de dépression: le stress chronique imprédictible (*Chronic Mild Stress*) chez le rat mâle Wistar.

Le chapitre IV: Étude comparative des effets du traitement au BCG chez des rats mâles et femelles Wistar ayant subi la ligature du nerf sciatique.

Le chapitre V: Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité à l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

Le chapitre VI: Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité au BCG.

Chapitre I-
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I- RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. 1. Définitions et physiologie du stress

I.1. 1. Définitions

I.1.1.1. Stress

La notion de stress, proposée en anglais par l'endocrinologue canadien Hans Selye, appartient d'abord au domaine de la biologie et de la psychologie. En français, le mot, comme son étymon, désigne la réponse de l'organisme aux facteurs d'agression physiologiques et psychologiques ainsi qu'aux émotions qui nécessitent une adaptation. Cette définition fait apparaître la complexité du concept de stress. Ce terme implique à la fois l'origine (pression, contrainte, surmenage) d'un processus psychologique et/ou physiologique, sa nature (épreuve, agression) et ses effets (détresse, oppression). Ces différents aspects impliquent à la fois une perception de l'organisme et différentes réponses qui l'accompagnent, en particulier l'émotion. Finalement, le stress constitue une réaction en chaîne, aussi bien psychologique quand il implique le psychisme (stress psychologique ou psychosocial) que physiologique. Ces réponses ont aussi une fonction : elles inaugurent et constituent une adaptation (**Selye, 1956**).

Pour le psychiatre, le stress ne peut être considéré comme un événement isolé intervenant sur un organisme. Il s'agit d'un processus psychosomatique, impliquant un environnement particulier qui interagit avec lui. Il est susceptible de se répéter à la suite d'un événement analogue ou associé et de se mémoriser. Il peut avoir des effets psychiques et somatiques, non seulement suivant une chaîne simple, mais aussi à partir des effets secondaires somato-psychiques et collatéraux qu'il aura initiés. Il est devenu aujourd'hui possible d'analyser plus précisément les corrélations qui existent entre un événement ou une situation (dont on peut définir les caractères et la durée), des paramètres biologiques spécifiques et certaines conséquences somatiques et psychiques. Ce qui est intéressant aussi, c'est que l'on part d'une modalité très proche de la réaction et du conditionnement pour arriver à la production de trajectoires psychopathologiques ou somatiques qui vont se définir en fonction d'adaptations secondaires de l'individu et de l'environnement (**Crocq *et al.*, 1982**).

I.1.1.2. Stress aigu et stress chronique

Dans les deux cas, la réponse de l'organisme se fait au niveau physique, psychologique et biologique. Elle est responsable des perturbations des différents métabolismes et de l'équilibre biochimique.

Le stress aigu correspond à une agression le plus souvent violente, physique ou psycho émotionnelle, et limitée dans le temps. Par exemple, une intervention chirurgicale, un grand traumatisme... La réponse de l'organisme est, elle aussi, immédiate, violente et intense. C'est une réponse de survie (**Boudarene et al., 1997**).

Le stress chronique correspond à des agressions violentes ou modérées, mais répétées et rapprochées dans le temps. Il entraîne un épuisement psychologique et glandulaire progressif responsable des maladies dites d'adaptation. La répétition de phénomènes de stress exige une adaptation fréquente et constitue à la longue une dose totale excessive dépassant le seuil de résistance de l'individu (**Boudarene et al., 1997**).

I.1.1.3. Stress cognitif et stress non cognitif

On considère aujourd'hui que les facteurs de stress se répartissent en deux groupes : le groupe des "stimuli cognitifs" et celui des "stimuli non-cognitifs".

Les stimuli cognitifs sont des facteurs de stress perceptibles par les organes des sens. Ils sont de nature abiotique (qualité de l'air ou de l'eau : température, quantité d'oxygène, salinité, présence de polluants, pratiques agricoles ou aquacoles) ou biotique (quantité ou qualité de nourriture, compétition, présence de prédateurs, surpopulation) (**Blalock, 1984**).

La notion de stimulus non-cognitif a été introduite par **Blalock en 1984**, en soulignant que le système immunitaire et le système neuroendocrine sécrètent un ensemble de molécules identiques et répondent à des messagers communs (neuropeptides, catécholamines et cytokines notamment). Blalock propose que le système immunitaire peut assurer une fonction d'organe sensoriel réagissant à des facteurs de stress qui ne sont pas perçus par les organes des sens classiques. En effet, les cellules immunitaires reconnaissent divers antigènes (virus, bactéries, protozoaires) qui menacent l'intégrité de l'organisme mais ne sont pas détectés par les organes des sens ou le système nerveux. Cette information est alors transmise au système neuroendocrine *via* des messagers hormonaux sécrétés par les cellules immunitaires ce qui déclenche une réponse au stress.

I.1.1.4. Stress biologique et stress psychique

Le stress biologique implique l'intervention d'agents physiques induisant une réponse non spécifique du système Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HPA). Le stress psychique est défini comme l'état dans lequel se trouve l'organisme placé dans des situations qui menacent le bien-être, l'intégrité physique ou psychique de l'individu. Le stress psychique présente les aspects suivants : il est déclenché par l'anticipation d'un danger, par le sentiment de frustration, par un état conflictuel. Les agents stresseurs agissent au niveau des structures nerveuses centrales capables de déchiffrer la signification menaçante de la situation. Le stress psychique n'est déclenché que si la situation est perçue par l'individu comme étant menaçante, frustrante ou conflictuelle. C'est donc l'évaluation cognitive de la situation qui donne une signification stressante aux stimuli de l'environnement. Les modifications comportementales et physiologiques qui en découlent caractérisent l'état de stress. À la différence du stress biologique qui est déclenché par l'action non spécifique des stresseurs, le stress psychique est initié par leur action spécifique. Le stress psychique survient lorsque la personne évalue la relation avec son environnement comme contraignante ou dépassant ses ressources. Il résulte d'un déséquilibre entre les sollicitations de l'environnement et les capacités de l'organisme à y faire face. La différence entre stress biologique et stress psychique concerne surtout les facteurs intervenant dans le déclenchement du stress. L'état de stress qu'il soit biologique ou psychique, implique ensuite une réponse de l'organisme dans sa globalité (**Chrousos et Cold, 1992**).

I.2. Physiologie du stress

Selye fut le premier à proposer une véritable théorie concernant le stress et ses effets sur l'organisme. Il remarqua que des perturbations différentes provoquaient un certain nombre de réponses similaires chez les animaux. D'après lui, ces réponses constituaient la base de ce qu'il appela le Syndrome Général d'Adaptation (SGA) (**Selye, 1956**). Le SGA comprend trois étapes. Une phase d'alarme ou phase initiale de la réponse, suivie par une phase de résistance au cours de laquelle l'organisme essaie de s'adapter à la perturbation et de rétablir l'homéostasie. Si l'organisme ne parvient pas à rétablir un équilibre, il entre dans une phase d'épuisement, qui peut conduire à l'apparition de diverses pathologies ou à la mort (**Selye, 1974**).

I.2.1. Réponse au stress (Syndrome Général d'Adaptation (SGA)).

Sous le terme de “réponse au stress”, on désigne aujourd’hui un ensemble de réactions comportementales et physiologiques permettant de maintenir l’homéostasie de l’organisme face à une situation défavorable (**Chrousos et Gold, 1992**). Les réactions comportementales ont pour but de stimuler l’attention, la vigilance, voire l’agressivité de l’animal (Figure I.1).

Les réactions physiologiques servent à rediriger l’énergie vers le système nerveux central, certains muscles et les parties éventuellement lésées de l’organisme de façon à faciliter son adaptation. Au cours de la réponse au stress, on assiste notamment à une augmentation de la fréquence cardiaque, de la fréquence respiratoire, de la pression sanguine, de la lipolyse, de la glycolyse et de la gluconéogenèse de façon à augmenter les quantités circulantes de substrats vitaux (oxygène et glucose notamment). Les fonctions physiologiques qui ne sont pas immédiatement nécessaires (croissance, reproduction, certaines fonctions immunitaires) sont inhibées (**Chrousos et Gold, 1992**). La capacité d’un organisme à s’adapter à une perturbation ne dépend pas uniquement de la rapidité et de l’efficacité avec lesquelles il met en place une réponse de stress. Elle dépend aussi en grande partie de sa capacité à générer une contre-réaction qui le protège d’une réponse au stress disproportionnée. En absence de contre-réaction, la réponse au stress perd ses propriétés adaptatives et contribue à l’apparition de troubles pathologiques. Chez l’Homme par exemple, une absence d’inhibition de la réponse au stress peut engendrer une anxiété chronique, une dépression, des troubles obsessionnels compulsifs ou une anorexie nerveuse (**Chrousos et Gold, 1992**).

La réponse de l’organisme au stress met en jeu le Système Nerveux Central (SNC), le Système Nerveux Périphérique (SNP) et le Système Endocrinien (SE) qui prennent en charge les stress selon trois phases (**Boudarene et al., 1997**) : réception du stress par les organes sensoriels et leurs innervations afférentes ; programmation de la réaction au stress au niveau du cortex et du Système Limbique (SL) (amygdale, bulbe olfactif, hippocampe, septum, corps mamillaire...) (Figure I.2). Le couple cortex/SL est un système d’analyse comparative utilisant comme banque de données des "souvenirs" issus d’expériences affectives et de l’apprentissage. Ainsi, le cerveau compare la situation nouvelle (le stress) à des expériences passées afin d’élaborer une réponse adaptée. La troisième phase est le déclenchement de la réponse de l’organisme *via* l’amygdale et l’hippocampe qui agissent sur l’hypothalamus et la formation réticulée du tronc cérébral afin d’activer le Système Nerveux Orthosympathique (SNVOS) et le Système Endocrinien (SE) (glandes surrénales).

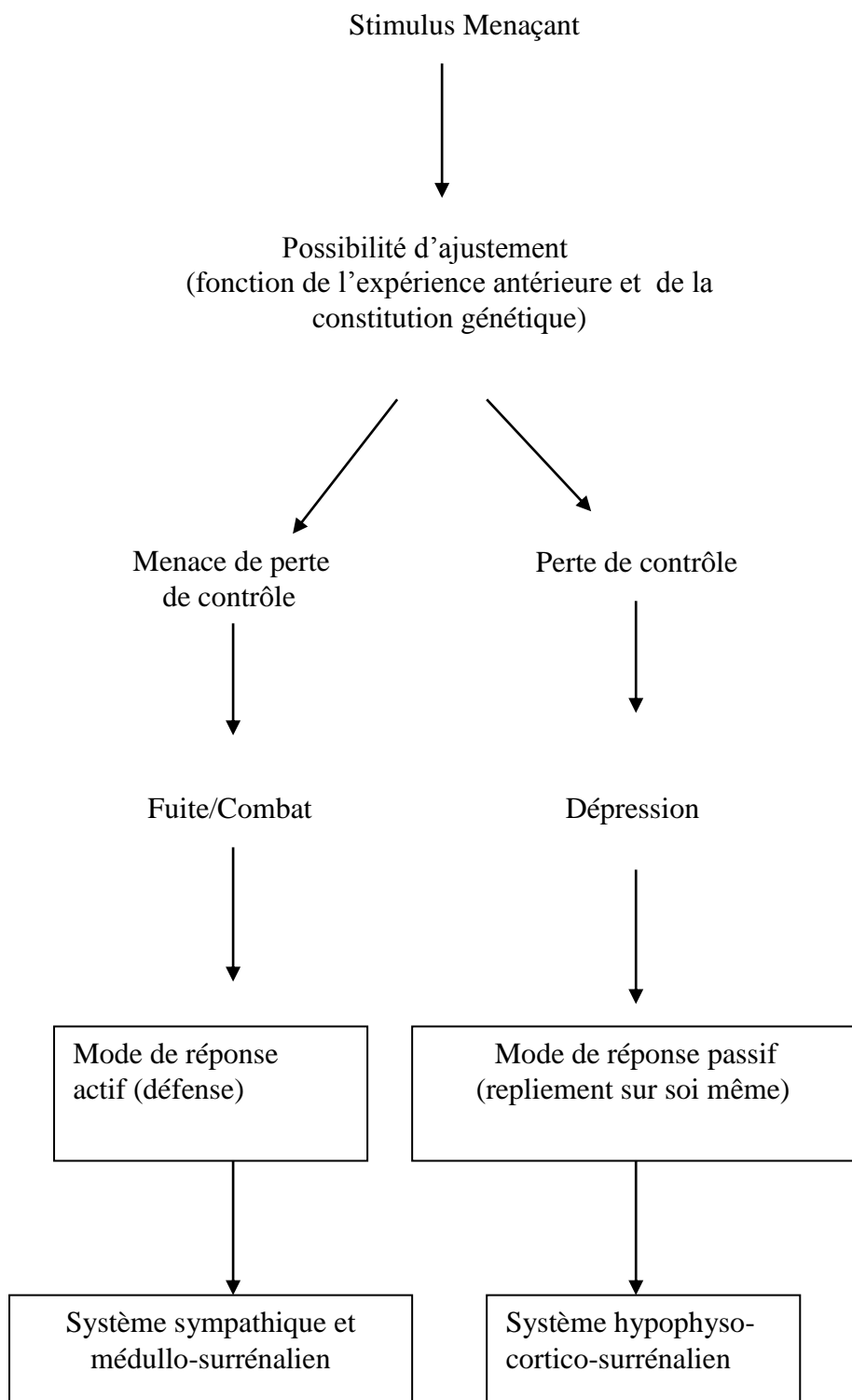


Figure I.1 : Orientation des réponses neuroendocriniennes à l’agression suivant le comportement adopté en face d’une situation (Dantzer et Mormède,1979).

La formation réticulée déclenche plus particulièrement la réaction d'alarme dont l'amplitude est modulée par le SL.

Le SGA représente toutes les modifications non spécifiques, c'est-à-dire indépendantes du type de stresser, qui se développent dans l'organisme et dans le temps au cours de l'exposition continue à un stresser. C'est la réponse apportée au facteur de stress. Elle se traduit par un ensemble de modifications biologiques responsables des différentes manifestations symptomatiques fonctionnelles et organiques (**Selye, 1974**). Le SGA se déroule dans sa forme typique en trois phases : une phase d'alarme ; une phase de résistance et une phase d'épuisement. Nous présentons, ci-après, les trois phases citées précédemment. Elles s'expriment par une répercussion au niveau neurobiologique et somatique, et au niveau comportemental et psychologique.

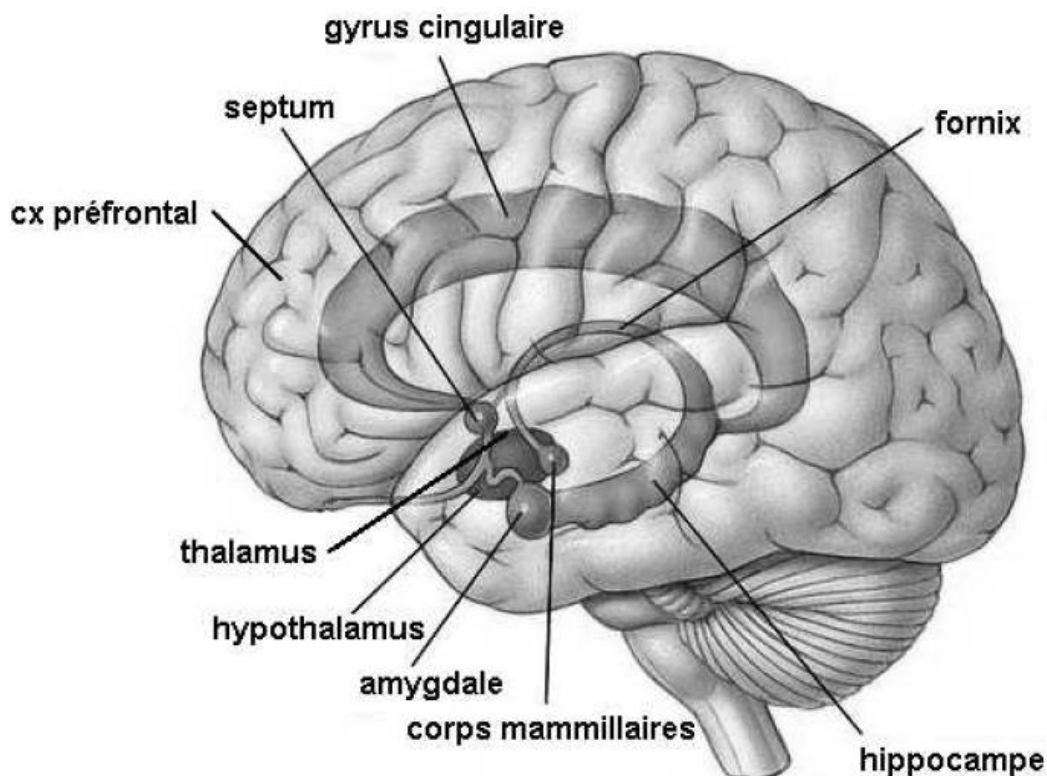


Figure I.2 : Représentation schématique des composants principaux du système limbique (amygdale, bulbe olfactif, hippocampe, septum, corps mamillaire...) (**BOWSHER, 1980**)

I.2.1.1. La phase d'alarme

Lorsque dans notre vie courante le stress augmente au-delà de ce à quoi nous sommes habitués, nous développons une réaction d'alarme encore appelée réponse de fait ou de combat. Elle est mise en route par l'effet du stress sur le cerveau par le biais d'hormones produites par l'hypothalamus et l'hypophyse, se traduisant finalement par une réponse des surrénales. Celles-ci sécrètent en premier lieu l'adrénaline puis le cortisol et la DHEA (déhydroépiandrostérone). Ce sont nos trois hormones du stress (**Boudarene et al., 1997**).

Au niveau neurobiologique et somatique :

Elle résulte de l'activation Ortho-Sympathique (OS) stimulant les organes impliqués dans la défense (l'appareil cardio-vasculaire, les poumons, le foie et les muscles) et inhibant les fonctions inutiles (digestion, reproduction, croissance). L'activation OS a un retentissement particulier sur la médullosurrénale qui est une glande endocrine dont les cellules chromafines libèrent, dans le sang, essentiellement de l'adrénaline lorsque la médullosurrénale est stimulée par le SNVOS. Ainsi les messagers moléculaires utilisés dans la réaction d'alarme pour stimuler les organes de défense sont la noradrénaline (NADR) pour la voie empruntant l'innervation OS des organes et l'adrénaline (ADR) pour la voie surrénalienne. Cette phase ne dure pas longtemps, de quelques minutes à quelques heures tout au plus. C'est la réaction de stress proprement dite, identique quel que soit l'agent agresseur (**Boudarene et al., 1997**).

Au niveau comportemental et psychologique :

Les situations de stress engendrent une série de comportements le plus souvent désordonnés et associés à une exacerbation de la vigilance et de l'état émotionnel par l'activation des voies noradrénergiques issues du *locus caeruleus* afin d'augmenter la vigilance par leurs impacts sur le cortex et le système limbique (SL). Il y a libération centrale de Bêta Endorphines pour lutter contre la douleur (réaction analgésique). Il peut s'agir d'une accélération des activités automatiques avec engagement irréfléchi dans des gestes et mouvements exécutés en vitesse mais sans but et sans précision. Par ailleurs, une suspension, voire une inhibition des activités avec vide de la pensée, trous de mémoire, impression de paralysie et d'incapacité seront observés. D'autres fois, les modifications émotionnelles réaliseront un état d'anxiété et d'affolement important ou un état de panique amenant à des activités stéréotypées et inefficaces. L'expression verbale peut être accélérée avec un discours plus ou moins cohérent qui peut se rapporter à l'événement en cause et à la signification qu'il prend dans la vie du

sujet. L'intérêt attribué aux propos tenus par le sujet peut, plus tard aider à comprendre le sens de la réponse de stress et être intégré dans la prise en charge thérapeutique. D'autre fois, le sujet est peu bavard, voire muet. Cette éventualité est souvent associée à un état d'inhibition motrice. Dans tous les cas, le sujet ressent ces phénomènes comme une rupture d'ordre psychologique (Crocq, 1992).

I.2.1.2. La phase de résistance

Elle accentue l'activité des systèmes noradrénergique et corticotrope. Elle met en jeu l'ensemble des systèmes hormonaux selon des modalités propres à chaque individu (Boudarene *et al.*, 1997). Elle fait suite à la réaction d'alarme si l'exposition au stress persiste et résulte en l'activation de l'HPA, lequel active la sécrétion des hormones glucocorticoïdes par les glandes corticosurrénales. Les neurones sécréteurs parvocellulaires du noyau arqué de l'hypothalamus sont activés par l'amygdale et l'hippocampe, ils libèrent dans le système "porte" de la circulation hypophysaire des neurohormones CRF (Corticotropin Releasing Factor ou corticolibérine). En plus de l'activation par le système limbique, l'hypothalamus est stimulé par l'innervation noradrénergique issue en particulier du *locus caeruleus* et du noyau du tractus solitaire, ce qui renforce la libération de CRF. Le CRF a pour cible les cellules endocrines (cellules corticotropes) de l'adénohypophyse qui répondent au CRF en sécrétant l'hormone hypophysaire ACTH (adrenocorticotrophin hormone ou corticostimuline). L'ACTH est libérée dans la circulation générale et active à distance les cellules de la corticosurrénale qui produisent les hormones corticoïdes (glucocorticoïdes, sexocorticoïdes, minéral corticoïdes).

I.2.1.3. La phase d'épuisement

Au niveau neurobiologique et somatique :

Lorsque le stress devient chronique (exposition prolongée et/ou répétée au stress), les capacités énergétiques de l'organisme s'épuisent, le pourcentage de glucose circulant chute, les cellules ne sont plus nourries correctement. Il se produit aussi une dérégulation de plusieurs systèmes neuronaux et endocriniens provoquant une élévation constante du taux de glucocorticoïdes. Des expériences menées chez l'animal indiquent que le stress chronique est associé à une diminution du rétrocontrôle négatif qu'exercent les glucocorticoïdes sur l'axe Hypothalamo-hypophysaire. Les possibilités de l'organisme sont dépassées, l'épuisement est atteint, c'est un état qui favorise l'apparition de pathologies. D'autant plus que les sécrétions en

glucocorticoïdes restent élevées et que les glucocorticoïdes ont un effet supprimeur sur l'immunité, qu'il y a un pourcentage élevé de cholestérol sanguin (associé à la lipolyse) (**Boudarene *et al.*, 1997**).

Au niveau comportemental et psychologique :

Pendant cette phase, des maladies somatiques et psychosomatiques peuvent se manifester avec plus ou moins de gravité. Les affections cardio-vasculaires accompagnent le plus souvent les sujets «sur-engagés» dans la lutte (troubles du rythme et infarctus sont les affections les plus fréquentes). Ces troubles sont habituellement rapportés à un dysfonctionnement du système cathécholaminergique. Les affections digestives (ulcère, colite, dyspepsies et troubles fonctionnels), les affections dermatologiques et immunitaires, notamment les déficiences, se rencontrent chez les sujets qui ont un comportement de «vaincus ». Le stress serait également impliqué dans la dépression. Il entraîne une dépression immunitaire due apparemment à l'hypercortisolémie chronique et serait responsable des troubles comportementaux et psychiques observés : retrait social avec indifférence, fatigue importante et baisse de l'intérêt pour l'alimentation. L'hyperactivation de l'HPA serait due principalement à une altération du rétrocontrôle négatif qui ne se ferait plus (**Boudarene *et al.*, 1997**).

I.3. Neuroimmunologie du stress : Interactions entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire.

I.3.1. Principales composantes du système immunitaire

Le système immunitaire a pour fonction principale de reconnaître et d'éliminer toute substance étrangère à l'organisme (les antigènes) et potentiellement dangereuse pour celui-ci, tout en épargnant l'organisme lui-même. Cette fonction recouvre la distinction entre le soi et le non-soi. C'est aux globules blancs, également appelés leucocytes, qu'est dévolue la responsabilité de la lutte contre les micro-organismes pathogènes. Ces cellules proviennent de cellules souches de la moelle osseuse. Elles circulent dans le sang et dans le système lymphatique et, pour certaines d'entre elles, se fixent dans les tissus.

L'immunité innée représente la première ligne de défense contre les antigènes. Elle met en jeu des cellules phagocytaires mononucléaires, les monocytes et les macrophages par exemple, et des cellules polynucléaires, les neutrophiles par exemple. Ces cellules capturent les microbes et les digèrent de façon à ce que les cellules mononucléaires puissent présenter les fragments antigéniques aux lymphocytes. Les lymphocytes ont des récepteurs spécifiques hautement diversifiés qui leur permettent de reconnaître les antigènes qui leur sont ainsi présentés (Castex, 2003).

L'immunité acquise est basée sur la prolifération et la différenciation de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné en une population de cellules effectrices. Les lymphocytes T (T pour thymus) présentent la particularité de se différencier et d'acquérir leur compétence immune dans le thymus avant de migrer dans la rate et les ganglions lymphatiques. Ce sont les premiers lymphocytes à être activés au contact de l'antigène présenté par les cellules mononucléaires. En présence de l'antigène, certains d'entre eux prolifèrent et détruisent les cellules infectées : ce sont les lymphocytes T cytotoxiques. D'autres aident des types cellulaires différents à intervenir : ce sont les lymphocytes T auxiliaires ou *helper*. Il y a plusieurs sous-classes de cellules T qui se distinguent les unes des autres par la nature de la ou des molécules qu'elles portent à leur surface. Ainsi, les lymphocytes T cytotoxiques sont des cellules CD8+, car elles expriment une glycoprotéine membranaire appelée CD8 (cluster de différenciation 8). Ces cellules interviennent dans l'immunité cellulaire. Les cellules T CD4+ sont indispensables pour l'activation des macrophages et des lymphocytes. D'autres lymphocytes, connus sous le nom de cellules tueuses naturelles (*natural killer* [NK]) sont spécialisés dans la reconnaissance des cellules tumorales dont ils peuvent, dans certaines

conditions, provoquer la mort. Les lymphocytes B (*bone marrow* ou moelle osseuse) se développent dans la moelle osseuse et se différencient en plasmocytes capables de produire des anticorps quand ils lient l'antigène en présence d'une sous-classe de lymphocytes T. Les lymphocytes B interviennent dans l'immunité humorale. Les anticorps, aussi appelés immunoglobulines (Ig), sont des molécules solubles qui s'attachent de manière spécifique à l'antigène qui est à l'origine de leur production. Cette liaison avec l'antigène permet sa destruction au travers de toute une série de réactions en cascade impliquant les molécules du complément. La réponse d'immunité humorale est sous-tendue par la formation d'un véritable clone de lymphocytes différenciés conservant en mémoire l'image moléculaire de l'antigène. De ce fait, toute nouvelle rencontre avec l'antigène se traduira par une réponse immune plus rapide et plus efficace que la première (**Castex, 2003**).

Les différentes cellules qui sont impliquées dans les réponses immunes communiquent les unes avec les autres et avec d'autres types cellulaires, les cellules endothéliales des vaisseaux par exemple, par l'intermédiaire de molécules d'adhésion pour permettre le contact physique entre les cellules et par des médiateurs solubles connus sous le nom de cytokines ou d'interleukines. Ces médiateurs sont responsables de la mise en place de la réponse immune et de sa régulation. Ils jouent donc un rôle capital dans la résistance de l'hôte aux agents infectieux. Chaque sous-type cellulaire produit des cytokines spécifiques. Les monocytes et les macrophages sont en première ligne dans la réponse contre les micro-organismes pathogènes. Ils portent à leur surface des récepteurs spécialisés dans la reconnaissance innée de motifs immuns, les récepteurs de type *Toll* (en anglais *Toll-like receptors* TLR). L'activation de ces récepteurs entraîne la production de cytokines dites pro-inflammatoires, puisqu'elles sont à l'origine de la réponse inflammatoire. Il s'agit essentiellement de l'interleukine 1 (IL-1), du facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) et de l'interleukine 6 (IL-6). Il existe deux sous-classes de cellules T CD4⁺ ou lymphocytes T auxiliaires, qui diffèrent par les cytokines qu'elles produisent et le type de réponse immune qu'elles induisent. Les lymphocytes Th1 sécrètent l'IL-2, l'interféron gamma (IFN- γ) et le TNF- α , alors que les lymphocytes Th2 libèrent de l'IL-4, de l'IL-6 et de l'IL-10. Les premières orientent la réponse immune vers l'inflammation et l'immunité cellulaire alors que les secondes l'orientent vers l'immunité humorale (**Castex, 2003**).

I.3.2. Mécanismes d'activation de l'axe du stress

I.3.2.1. Mécanismes d'activation par les facteurs cognitifs (Figure I.3)

Les glucocorticoïdes sont les produits finaux de l'activation de l'axe du stress et les médiateurs les plus importants des interactions entre systèmes nerveux et immunitaire (**Munck et Guyre, 1991**). Leurs actions inhibitrices sur le système immunitaire sont extrêmement diverses. Ils modifient la distribution tissulaire des lymphocytes T et B et les réponses *in vitro* à l'action de différents antigènes ou mitogènes. À l'inverse, les neutrophiles circulants augmentent. La prolifération des monocytes/macrophages, qui sont impliqués dans la présentation de l'antigène aux lymphocytes, est inhibée par les glucocorticoïdes ainsi que la production de lymphokines (IL-2) qui stimulent leurs fonctions. L'effet des glucocorticoïdes sur les cellules productrices d'anticorps, les lymphocytes B, est moins net : les cellules stimulées par un antigène semblent être peu sensibles, alors que les cellules non stimulées le sont. Enfin, les glucocorticoïdes diminuent l'activité des cellules tueuses (NK). Cette inhibition s'exerce par l'intermédiaire de récepteurs aux glucocorticoïdes (**Sapolsky *et al.*, 1986 ; Munck et Guyre, 1991 ; Sapolsky *et al.*, 2000**).

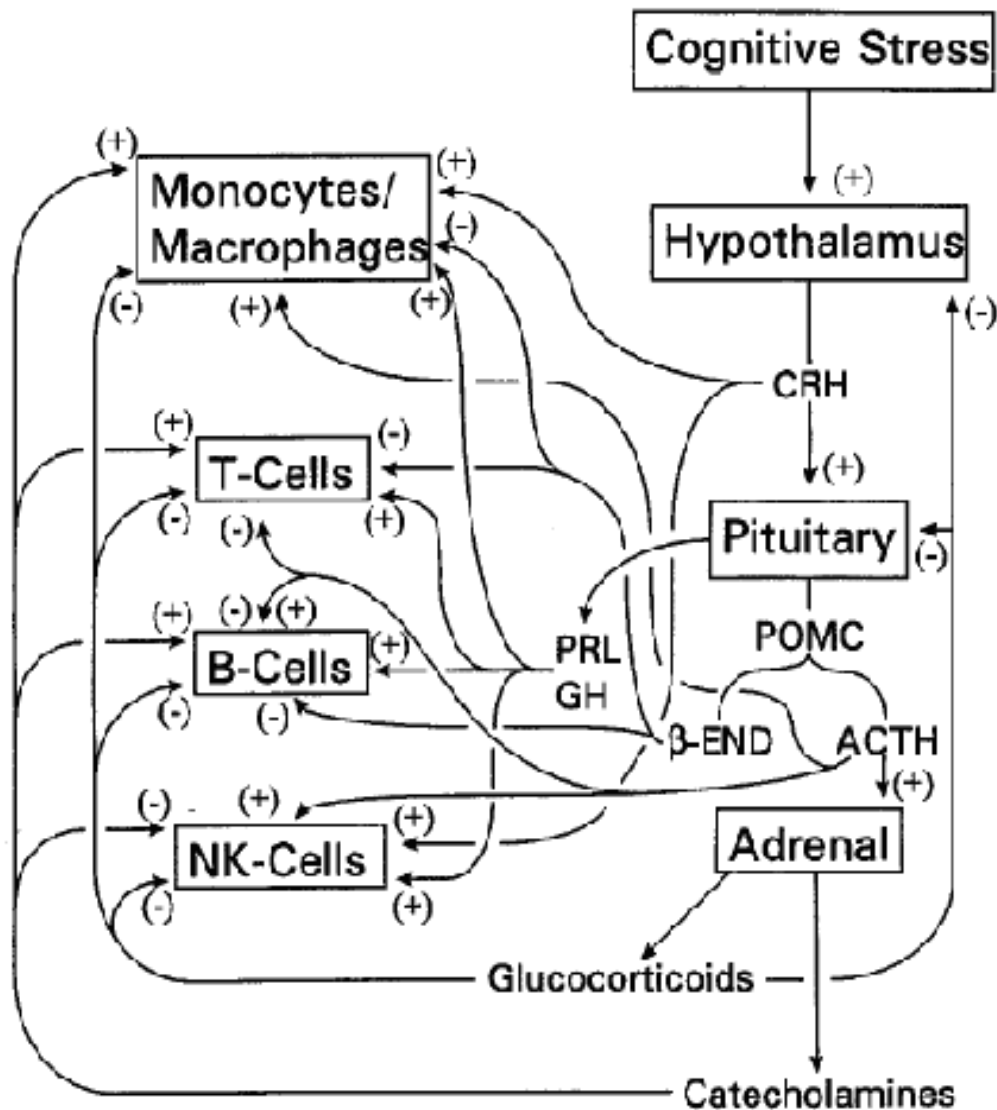


Figure I.3 : Mécanismes d'activation de l'axe du stress par les facteurs cognitifs (Blalock, 1984).

Ces récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires qui, après formation du complexe hormone-récepteur, vont cibler des gènes. En résumé, les glucocorticoïdes inhibent de grandes fonctions du système immunitaire : croissance des cellules lymphoïdes, formation d'anticorps, cytotoxicité cellulaire, réaction inflammatoire. Malgré l'existence d'un petit nombre de données expérimentales qui montrent qu'un stress aigu pourrait avoir un rôle immunostimulant (Dhabhar, 1998), la grande majorité des données indique un effet inhibiteur du stress sur l'immunité. Il est donc clair que toute situation physiopathologique qui élève de façon importante et continue le taux de glucocorticoïdes circulants conduit à une diminution importante de l'activité du système immunitaire.

En outre, l'activation de l'axe du stress implique la libération par l'hypophyse d'une protéine précurseur : la Pro-opiomélanocortine (POMC), qui se clive en ACTH, endorphine et différents peptides biologiquement actifs (**Brown, 1994**). En expérimentation animale, l'injection d'ACTH a l'effet inhibiteur par l'intermédiaire de l'action des glucocorticoïdes, mais aussi une action directe puisque des récepteurs de l'ACTH sont présents sur des cellules lymphoïdes (**Besedovsky et al., 1986**). En ce qui concerne les endorphines, leurs effets *in vitro* peuvent être immunostimulant ou immunosuppresseur en fonction du type cellulaire considéré, de la concentration et des conditions expérimentales (**Besedovsky et al., 1986**). Il en est de même *in vivo*, leur administration est le plus souvent immunosuppressive mais peut être aussi immunostimulante chez l'Homme comme chez l'animal. Parmi les autres hormones protéiques hypophysaires seules la GH et la prolactine ont un rôle immunostimulant *in vivo* et *in vitro* (**Besedovsky et al., 1996**) et pourraient antagoniser les effets du stress sur les fonctions immunes.

Par ailleurs, on a mis en évidence une action des neuromédiateurs du système nerveux autonome sur le système immunitaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. La destruction des systèmes d'innervation sympathique ou parasympathique induit des effets complexes conduisant le plus souvent à une hyperactivité du système immunitaire et en particulier, à la production d'anticorps. Il en est de même pour des neuropeptides tels que la substance P, le polypeptide intestinal vasoactif (VIP), la somatostatine et le neuropeptide Y. Tous sont inhibiteurs, à l'exception de la substance P qui stimule le système immunitaire (**Besedovsky et al., 1996**).

1.3.2.2. Mécanismes d'activation par les facteurs non cognitifs (Figure I.4)

En 1975, **Besedovsky et al.** ont montré pour la première fois que la réponse immunitaire peut elle-même provoquer des changements de la réponse hormonale principalement *via* les cytokines. Ces derniers sont médiateurs de l'immunité et l'inflammation, participent à des fonctions biologiques très diverses dans plusieurs systèmes, dont le SNC. L'IL-1, par exemple, est produit par les macrophages en réponse à des agressions pathogènes, ou encore dans d'autres situations stressantes. La présence de cytokines inflammatoires dans le cerveau a été initialement attribuée à une synthèse exclusive par les cellules myélo-monocytaires infiltrantes, puisque les cellules nerveuses n'étaient pas supposées produire et utiliser ces molécules. Puis des études sur des cellules en culture ont montré une capacité de synthèse du TNF α par les cellules gliales, les astrocytes et surtout par la microglie (**Holsboeur, 1999**).

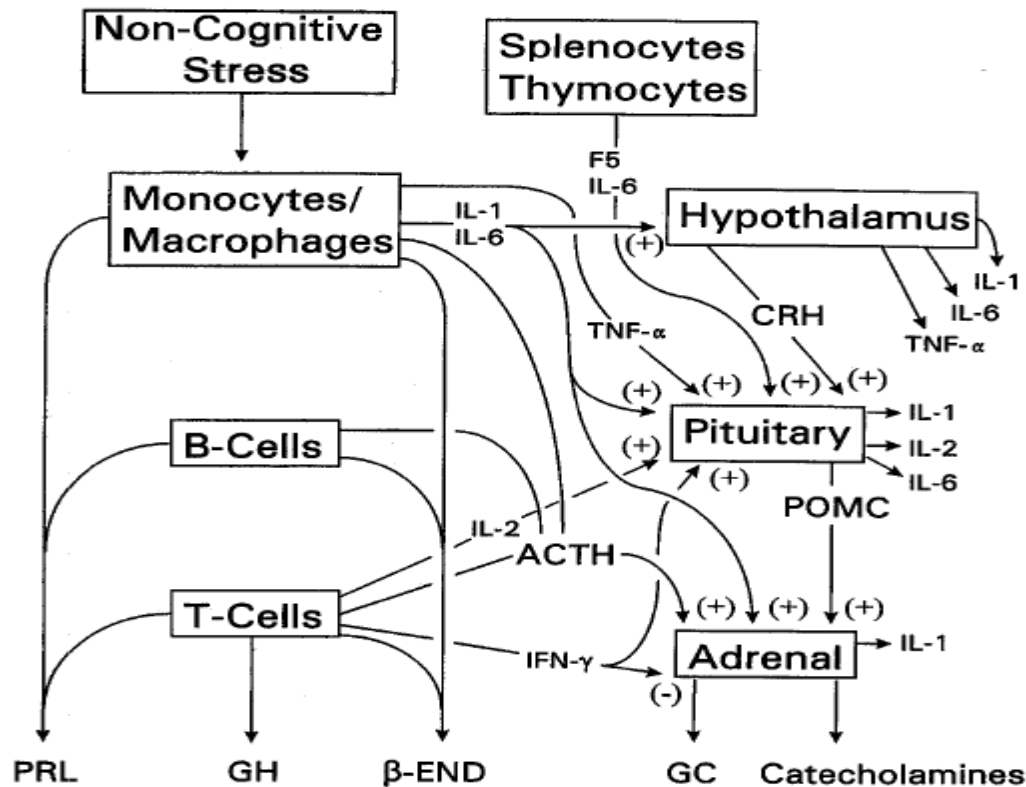


Figure I.4 : Mécanismes d'activation de l'axe du stress par les facteurs non cognitifs (Blalock, 1984).

Haour (1998) a pu caractériser des récepteurs spécifiques de IL-1 dans le cerveau de souris au niveau de neurones (gyrus dentelé de l'hippocampe), de structures vasculaires (plexus choroïde et vaisseaux), l'hypothalamus ou encore dans des structures cérébrales directement connectées à l'hypothalamus. Les récepteurs à IL-1 sont plus denses dans l'hippocampe et l'hypothalamus (**Vitkovic et al., 2000**). L'hypothalamus présente des récepteurs à cytokines (récepteurs d'IL-1). L'IL-1, l'interféron et le TNF α ont une action activatrice sur l'axe HPA (**Mekaouche et al., 1996**). La libération par les surrénales de glucocorticoïdes inhibe la réponse inflammatoire et permet de contenir la réaction immunitaire. Le noyau para ventriculaire de l'hypothalamus (NPV), où sont localisés les neurones producteurs de CRH, est sensible à l'action de l'IL-1 et à celle de son antagoniste, l'IL-1Ra (**Cartmell. et al., 1999**). La libération de CRH, est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1, TNF α , mais inhibée par la cytokine anti-inflammatoire TGF α . L'activation de l'axe HPA par les cytokines s'accompagne également d'effets sur le métabolisme de certains neuromédiateurs. Ainsi l'administration d'IL-1 stimule le métabolisme de la noradrénaline et de la sérotonine,

notamment dans l'hypothalamus. Ces effets sont semblables à ceux qui sont obtenus par administration du LPS (**Haour, 1998**).

Les interleukines agissent directement sur les cellules hypophysaires en culture induisant une sécrétion importante d'ACTH, LH, FSH et GH (**Bernton et al., 1987**). L'injection d'un antigène à des souris montre une augmentation du taux plasmatique de corticostérone. En **1987**, **Bernton et al.** démontrent le rôle central de l'IL-1 dans cette réaction, en effet l'injection d'IL-1 humaine à des souris et des rats provoque l'augmentation des taux sanguins d'ACTH et de glucocorticoïdes. Ils montrent aussi que la mise en culture des cellules hypophysaires de rat en présence d'IL-1 bêta humaine augmente la sécrétion d'ACTH, LH, GH et de TSH. L'addition d'IL-1 et de recombinant d'IL-2 humaine à une culture de cellules hypophysaires de rats provoque une augmentation de l'ARNm cytoplasmique permettant la synthèse de la POMC. Les interleukines pourraient agir donc de la même manière que le CRF (**Sapolsky et al., 1987; Bernton et al., 1988**). Le cortisol inhibe la production d'IL-1 par les macrophages mis en culture en présence de LPS (**Stites et al., 1983**). **Haour et al. (1998)** ont pu caractériser des récepteurs d'IL-1 dans le cerveau de souris (neurones, structure vasculaires, méninges, hypothalamus et hypophyse). Ces chercheurs ont permis de démontrer que les récepteurs centraux sont profondément modifiés par l'administration des produits bactériens (LPS), alors que les récepteurs de l'hypophyse demeurent inchangés.

I.4. Stress et pathologies psychiatriques

Les facteurs de stress psychosociaux peuvent contribuer au déclenchement ou à l'aggravation d'un trouble mental. Dans l'évaluation diagnostique du patient présentant un trouble psychique, nous retrouvons sur l'axe IV du DSM-IV les entités suivantes : problèmes avec le réseau de soutien principal (famille, couple.), problèmes liés à l'environnement social, problèmes scolaires, professionnels, domestiques, financiers, difficultés d'accéder aux soins de santé, problèmes légaux et judiciaires, autres problèmes psychosociaux et environnementaux (catastrophes naturelles, guerre, etc.) (**Bourgeois, 1993**).

I.4. 1. Stress et anxiété

L'anxiété ou l'angoisse est une émotion normale survenant dans des situations nouvelles surtout lorsqu'elles sont étrangères, inattendues ou hostiles. Elle permet à l'individu de s'adapter en modifiant son comportement ou son environnement. Le seuil de tolérance à cette émotion varie d'un individu à l'autre (**Bourgeois, 1993**). Elle devient pathologique lorsqu'elle

est trop intense, empêchante, désorganisatrice ou lorsqu'elle se chronicise. Elle paralyse l'individu dans ses capacités à faire face ou coping.

Lorsque le sujet est dépassé dans ses mécanismes d'adaptation face à une demande de l'environnement, il apparaît rapidement un état de crise. Certaines crises aboutiront à une maturation de l'être humain, d'autres ne permettront pas de réponse adaptative adéquate. Les dernières seront susceptibles de provoquer des états psychopathologiques tels que les troubles anxieux, les troubles dépressifs ou psychosomatiques (**Crocq, 1992**).

Les critères diagnostiques du DSM-IV classent les troubles anxieux en onze catégories : trouble panique avec ou sans agoraphobie, agoraphobie sans antécédent de trouble panique, phobie spécifique, phobie sociale, trouble obsessionnel-compulsif, état de stress post-traumatique, état de stress aigu, anxiété généralisée, anxiété due à un trouble somatique, trouble anxieux non spécifié. Quant à elle, la réaction aux facteurs de stress psychosociaux est décrite sous forme de trouble de l'adaptation dont le caractère inadapté peut se traduire par les manifestations suivantes dans les trois mois qui suivent la confrontation aux agents stressants : humeur dépressive, humeur anxieuse, caractéristiques émotionnelles mixtes (anxio-dépressives), perturbation des conduites, perturbation mixte des émotions et des conduites, autres troubles non spécifiés.

Le trouble panique est un trouble émotionnel qui se caractérise par l'apparition inopinée et la répétition d'épisodes d'attaques de panique. L'attaque de panique se traduit par l'apparition soudaine de palpitations, sensations d'étouffement, tremblements, sueurs, nausées, malaise digestif... accompagnés de l'impression de mourir, de perdre le contrôle de soi-même, ou de devenir fou. Le trouble panique sera défini par la récurrence de ces attaques de panique. Le sujet développera souvent une peur importante de la récurrence : anxiété d'anticipation.

La première attaque de panique survient classiquement de manière soudaine et inopinée. Elle correspond parfois à des circonstances particulières : accident, maladie, deuil, séparation, prise de drogue... Pour de nombreux auteurs, deuils et séparations seraient des facteurs précipitants fréquemment retrouvés (**Galinowski, 1993**). Certains modèles expliquent que les patients anxieux posséderaient des schémas latents en rapport avec une vulnérabilité personnelle. Ces schémas pourraient être activés dans certains contextes comme les situations stressantes (**Thomas-Antérion et al., 1998 ; Bergeret et al., 1993**).

I.4. 2. Stress et dépression

On admet généralement que les états dépressifs se développent de plus en plus dans le monde. Si l'on s'en tient aux états dépressifs pathologiques proprement dits, les statistiques de l'Organisation Mondiale de la Santé estiment que la dépression est la quatrième maladie répandue dans le monde. On craint que le poids de la dépression dans les dépenses de la santé publique augmente dans l'avenir.

Sous l'appellation de dépression nerveuse ou sous celle, plus juste, d'état dépressif, on désigne en psychiatrie un état pathologique fondé essentiellement sur deux séries de troubles: d'une part, une modification pénible de l'humeur faite de pessimisme, de sentiments d'incapacité, d'impuissance, de dévalorisation de soi-même, de culpabilité; d'autre part, un ralentissement de l'activité générale, des fonctions intellectuelles et du comportement psychomoteur. À ces deux séries de symptômes s'associent d'autres troubles, le plus souvent physiques: douleurs, troubles digestifs, manque d'appétit, diminution de la libido, troubles du sommeil (insomnie; plus rarement, hypersomnie; quelquefois dyssomnie, c'est-à-dire impression de mauvais sommeil) (**Brochier et Olié, 1993**).

On décrit deux grandes formes cliniques de dépression, qu'on désigne par les appellations tantôt de dépression mélancolique et de dépression névrotique, tantôt de dépression endogène et de dépression exogène. Tout en se gardant de les rattacher à des catégories nosologiques discutables. On repère, d'une part, des états dépressifs majeurs, d'autre part, des états dépressifs mineurs (les premiers correspondant à peu près aux dépressions mélancoliques, les seconds aux dépressions névrotiques).

Des événements survenus précocement dans l'existence pourraient conditionner plus tard l'apparition de manifestations dépressives. Il s'agit de facteurs favorisants ou prédisposants qui sont souvent regroupés sous le terme de vulnérabilité. Les événements de vie stressants ont un rôle dans l'apparition ou l'évolution des états dépressifs. Il s'agit de facteurs précipitants ou déclenchants (**Brochier et Olié, 1993**).

En dehors de deux grandes formes cliniques que sont la dépression mélancolique et la dépression névrotique, il existe des états dépressifs qui sont des réactions à un surmenage ou à des pertes mais à propos desquels on ne peut pas pour autant faire l'hypothèse d'une personnalité névrotique dépressive sous-jacente. Un certain nombre d'affections somatiques peuvent commencer à se manifester par un état dépressif, notamment des affections cérébrales

(traumatisme crânien, tumeur cérébrale, insuffisance circulatoire cérébrale). Il en est de même de certaines atrophies cérébrales séniles ou préséniles d'origine autre que vasculaire. L'état dépressif peut apparaître aussi comme la première manifestation d'une évolution cancéreuse sous-jacente qui se manifestera quelques mois plus tard. De même, un certain nombre d'affections endocriniennes (insuffisance surrénale, hypothyroïdie...) peuvent, au cours de leur évolution, s'accompagner d'un état dépressif. La dépression complique l'évolution des maladies chroniques : diabète, athérosclérose, cancer soulevant des problèmes thérapeutiques **(Brochier et Olié, 1993)**.

Chapitre II-
Etude des effets du polyphénol E chez un modèle animal
de dépression:
Le stress chronique imprédictible (Chronic Mild Stress)
chez le rat mâle Wistar.

Chapitre II- Etude des effets du polyphénol E chez un modèle animal de dépression: Le stress chronique imprédictible (*Chronic Mild Stress*) chez le rat mâle Wistar.

RESUME

L'objectif de la présente étude est d'examiner les changements comportementaux et hormonaux suite au stress chronique imprédictible ou *chronic mild* (ou unpredictable/variable) *Stress stress* (CMS) (modèle animal de dépression) chez le rat mâle Wistar et d'évaluer les effets thérapeutiques d'un antioxydant le Polyphénol E (Poly E). Le programme du CMS est appliqué pendant 40 jours ; Poly E est administré à deux doses 5g/"L" et 10g/"L" durant le CMS. Les changements comportementaux sont estimés à travers la mesure de la dépression au test de la nage forcée et de l'anxiété au test du labyrinthe en croix surélevée. Le test de préférence sucrée (anhédonie) et la consommation d'aliment sont également évalués. Au terme de l'expérimentation, la testostérone plasmatique et les poids relatifs des organes (Cerveau, surrénales et testicules) sont mesurés. Le CMS diminue les niveaux de testostérone et fait augmenter les poids relatifs des testicules. Par ailleurs, le CMS génère la dépression et l'anxiété chez l'animal, respectivement au test de la nage force et au labyrinthe en croix surélevée et diminue la consommation d'eau sucrée et de l'aliment. L'administration du Poly E1 (5g/"L") chez ces animaux stressés paraît contrebalancer ces effets, ce qui dénote un effet anxiolytique et antidépresseur de cet antioxydant.

Key words: CMS, Polyphénol E, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Behavior, Dépression.

ملخص :

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة التغيرات السلوكية والهرمونية بسبب الإجهاد المزمن أو مزمنة في فئران ويستار الذكور وتقييم الآثار العلاجية (نموذج حيواني الاكتئاب) (CMS) الضغط الخفيف imprédictible G / في جرعتين E 5 لمدة 40 يوما؛ ويدير بولي CMS يتم تطبيق برنامج (بولي) Polyphenon E للمضاد للأكسدة و وتقدر التغييرات السلوكية من خلال قياس اختبار الفراغ واختبار السباحة القسري للقلق. CMS خلال "L" / G أو "L" 10 في نهاية التجربة، هرمون. ويفضل أن يتم تقييم أيضا اختبار الحلو (انعدام التلذذ) واستهلاك العلف. في متاهات عبر مرتفعة يقلل مستويات هرمون CMS. تستوستيرون البلازما والوزن النسبي لأجهزة (الدماغ والغدد الكظرية والخصيتين) تم قياس الاكتئاب والقلق لدى الحيوانات، CMS génère علاوة على ذلك، تستوستيرون، ويزيد من الوزن النسبي للخصية aliment. إدارة بولي E1 (5G / واختبار التوالي القوة والسباحة في متاهة عبر مرتفعة ويقلل من استهلاك الماء والسكر و في هذه الحيوانات تبدو الضغوط مواجهة هذه الآثار التي تدل على تأثير مضاد للاكتئاب ومزيل للقلق من هذا ("L" .. المضادة للأكسدة

الكلمات الرئيسية : CMS (EGCG) ، بيبغاللوكاتيشين-3-غالاتي Polyphenon E والسلوك، والاكتئاب

ABSTRACT

The aim of the present study is to examine behavioral and hormonal changes in chronic mild stress (CMS) depression model in male Wistar rats and evaluate the possible effects of Polyphenon E (PolyE) therapy. CMS (for 40 days) was applied; Poly E (5g/"L" or 10g/"L") was administered during CMS. To evaluate behavioral changes, forced swimming test (depression) and plus maze test (anxiety) parameters were calculated. The sucrose intake test and food intake were also evaluated. At the end of the experiment plasma testosterone and relative organ weight (brain, adrenal and testes) were assessed. The CMS decreases testosterone levels, increases relative adrenal weight and generated in animals depressogenic-like, anxiogenic-like behavior, and the loss of sucrose and food intake. Contrary, the administration of Poly E1 (5g/"L") to CMS group seems to reverse adrenal weight and testosterone levels and causes antidepressive-like and anxiolytic-like behavior. Polyphenon E could improve negative changes caused by CMS.

Key words: CMS, Polyphenon E, Epigallocatechin-3-gallate (EGCG), Behavior, Depression.

II.1. INTRODUCTION

Il a été bien établi depuis longtemps que le stress chronique est intimement lié à la physiopathologie des troubles de l'humeur (Van, 2004). La dépression majeure est un trouble de l'humeur caractérisé par des symptômes cliniques répertoriés dans le DSM-IV tels que l'anhédonie (l'incapacité à éprouver du plaisir) (American Psychiatric Association, 2000), des perturbations de la neurochimie cérébrale (Oguzhanoglu et al., 2014) et les maladies du système Endocrinien (Fava et al., 1987; Frih et al., 2009).

Deux des plus importants biomarqueurs hormonaux liés à la dépression sont une réduction des niveaux de la testostérone plasmatique et une hypercortisolémie chronique associée à une altération du *feed-back* négatif dans l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HPA) (Nemeroff, 1988 ; Frih et al., 2010). Par ailleurs, il a été rapporté que parmi les multitudes des facteurs impliqués dans physiopathologie de la dépression, le stress oxydatif occupe une place importante. La théorie du stress oxydant dans la dépression peut être expliquée par le concept suivant lequel des quantités excessives de radicaux libres sont toxiques pour les cellules neuronales et peuvent affecter l'activité physiologique du cerveau (Filomeni et Ciriolo, 2006). Les espèces réactives oxygénées sont très instables par nature et ont le potentiel d'endommager les protéines cellulaires, les lipides et les acides nucléiques (Filomeni et Ciriolo, 2006). Les enzymes antioxydants endogènes sont des piègeurs des radicaux libres (Filomeni et Ciriolo, 2006). Cependant, l'accumulation accrue de radicaux libres en raison de l'augmentation de production et / ou les irrégularités de résultats de défense antioxydant dans le stress oxydatif dans le cerveau qui aboutissent à l'élaboration de déficits psychologiques tels que la dépression (Vargas et Arnett, 2013).

En psychiatrie expérimentale, les modèles animaux sont un outil important pour étudier les théories neuropsychologiques de troubles spécifiques, tels que la dépression (Willner, 1997). En conséquence, un modèle animal a été développé par Willner et al. (1997) en utilisant une variété des stress chroniques qu'on appelle communément *chronic mild stress* (CMS) chez les rongeurs pour imiter les modifications physiopathologiques associées à des événements stressants qui peuvent invoquer le comportement de la dépression (*depression-like*). Le paradigme (CMS) est constitué de plusieurs facteurs des stress imprédictibles qui sont analogues à ceux rencontrés chez les humains. Les animaux sont soumis à une variété de facteurs de stress variés tous les jours. Après plusieurs semaines, les animaux montrent une diminution de la consommation des solutions sucrées agréables au

goût. Ce comportement est connu sous le terme d'anhédonie, qui est le caractère central de la dépression (**Willner, 1997**).

Les antioxydants sont des molécules qui peuvent interagir avec les radicaux libres et briser la réaction en chaîne avant que les molécules vitales soient endommagées. Il a été suggéré que les fruits et légumes peuvent jouer un rôle important en retardant l'apparition de certaines maladies, telles que certains cancers, des maladies cardio-vasculaires et les maladies dégénératives, et présentent des vertus thérapeutiques antioxydantes contre ces maladies (**Rice-Evans, 1999**). À ce jour, plus de 3000 flavonoïdes ont été identifiés. Ceux-ci peuvent être trouvés principalement dans les pigments des fleurs ou des feuilles (**Marfak, 2003**). Les flavonoïdes sont principalement connus pour leurs propriétés antioxydantes, vasculoprotectrices (**Vitor et al., 2004**), anti-inflammatoires et antidiabétiques (**Marfak, 2003**). Le thé vert contient une quantité considérable de composés polyphénoliques et ces dernières années les polyphénols du thé vert ont suscité, de plus en plus, l'attention des chercheurs travaillant sur la neuroprotection cérébrale.

Le thé vert contient plusieurs composants de catéchines, bien que l'épigallocatechine-3-gallate est la catéchine la plus importante et représente 50-80% (**Khan et al., 2006**). Épicatéchine-3-gallate est la deuxième composante de catéchine du thé vert, et est associé à ses propriétés anti-inflammatoires/antioxydantes (**Rice-Evans, 1999**). D'autres grandes catéchines du thé vert comprennent l'épicatéchine et l'épigallocatechine. Le Polyphénol E (PolyE) est un mélange pharmaceutique phytothérapeutique qui contient au moins cinq catéchines différentes: épicatéchine, gallocatechine gallate, l'épigallocatechine, gallate d'épicatéchine, et l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), avec EGCG étant le plus Abondant (**Yun et al., 2001**).

Le but de la présente étude est d'examiner les changements comportementaux et hormonaux dans le modèle de la dépression CMS chez le rat mâle Wistar et d'évaluer les effets du traitement au Polyphénol E.

II.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.2.1. Animaux d'expérience

Des rats Wistar mâles adultes (achetés auprès de l'Institut Pasteur, Alger), pesant entre 200 et 300 g ont été utilisés. Les rats ont été logés dans des cages en polypropylène. La litière composée de copeaux de bois est changée tous les deux jours. Les conditions ambiantes d'élevage sont bien contrôlées; la photopériode est de 12 "h" de lumière et 12"h" d'obscurité (lumière allumée à 07:00 du matin) et la température est de 22±2°C. L'eau et la nourriture sont servies *ad libitum*. Les animaux sont manipulés soigneusement 3 à 5 minutes par jour par l'expérimentateur avant le début de l'expérience.

Après une période d'acclimatation de 15 jours, 32 rats mâles ont été divisés en 4 groupes (Figure II.1):

Un groupe d'animaux **contrôle** (n = 8),

Un groupe de 8 rats soumis à un stress chronique pendant 6 semaines (**CMS**),

Un groupe de 8 rats stressés et traités avec le Poly E à la dose de (5g / "L" d'eau consommée) symbolisé **CMS + PolyE1**et

Un groupe de 8 rats traités à la dose de (10g / "L") symbolisé **CMS + PolyE2**.

Le Poly.E est administré pendant 40 jours à un volume constant de 5g / "L" (Poly E1) et 10g / "L" (Poly E2), sauf avant l'essai de préférence sucrée ou quand les animaux sont soumis à une privation d'eau au cours du CMS.

Le protocole expérimental du CMS est tracé dans le tableau II.1.

Tableau II.1 : Programme du Stress chronique imprédictible (CMS) appliqué.

Jour	Facteur de stress	Durée
1	Privation d'eau	24 h
2	Privation de nourriture	24 h
3, 4, 5	Isolement	24 h
6	Lumière clignotante	3 h
7	Privation de nourriture	24 h
8	Nage forcée	10 min
9	Litière humide	1 h
10	Privation d'eau	24 h
11, 12	Aucun stress	-
13	Litière humide + 4°C	1 h 30
14	Lumière clignotante	2 h 30
15	Privation de nourriture	24 h
16	Nage forcée	15 min
17, 18, 19	Isolement	24 h
20	Privation de l'eau	24 h
21	Privation de nourriture	24 h
22	Lumière clignotante	3 h
23	Litière humide	1 h
24, 25	Isolement	24 h
26	Litière humide + 4°C	1 h 30
27	Nage forcée	10 min
28	Lumière clignotante	3 h 30
29	Aucun stress	-
30	Privation de nourriture	24 h
31	Litière humide	1 h
32	Lumière clignotante	3 h
33	Privation d'eau	24 h

Les comportements liés à la dépression ont été évalués avant (état basal) et après la procédure CMS par le labyrinthe en croix surélevée (*Elevated plus maze test: EPM*) (pour mesurer le degré d'anxiété) et le test de la nage forcée (*Forced swimming test: FST*) (Pour mesurer le degré de dépression). Le protocole expérimental est montré dans la Figure II.1.

Le protocole expérimental a été approuvé par le Comité scientifique de la Faculté des Sciences de l'Université BADJI Mokhtar-Annaba qui est compatible avec les principes de la santé animale (NIH Publication n ° 85-23, révisé 1985).

II.2.2.2. Mesure de la consommation d'aliment

La nourriture composée de « pelletes » de composition alimentaire standard pour rat a été fournie aux animaux (ORAVIE el Harrouch, Skikda, Algérie). Chaque rat reçoit le jour du test une quantité « pré-pesée » (dans une boîte) d'aliment. L'aliment restant après 8h de consommation libre est repesé. La différence de poids a été calculée. La consommation de nourriture a été réalisée les jours : 3, 8, 16, 22 et 31.

II.2.3. Test de préférence sucrée (anhédonie)

Tous les rats ont été soumis à 48 h d'exposition forcée d'habituation à une solution contenant 1% de saccharose, au cours de laquelle la solution de saccharose était le seul liquide disponible pour la consommation, suivie de deux jours d'accès libre à la nourriture et à l'eau. Après cela, les rats ont été soumis à la privation d'eau pendant 16"h" avant d'effectuer le test de préférence sucrée proprement dit. Cette procédure d'habituation et privation n'est réalisée que la première fois au début d'expérimentation, c'est-à-dire. au test de base au jour zéro.

Le test de préférence a été réalisé en se basant sur la littérature (**Casarotto et Andreatini, 2007**). La préférence sucrée est calculée les jours 0, 11, 21, 34 et 39. Ce test consiste à mettre dans deux bouteilles de l'eau sucrée (1%) et de l'eau douce du robinet. Ces deux bouteilles sont « pré-pesées » avant de les présenter à l'animal. Les bouteilles sont pesées de nouveau 1"h" après et la consommation d'eau sucrée est calculée selon la formule suivante:

Préférence sucrée= [Consommation de l'eau sucrée sucrose/ Consommation de l'eau sucrée sucrose+eau douce] X100.

II.2.4. Application du stress chronique (CMS)

Le stress chronique légère (CMS) a été utilisé selon la littérature (**Willner, 2005**). Les 3 groupes de la CMS, CMS + PolyE1, CMS + PolyE2 ont été soumis à 40 jours de stress chronique imprédictible (Tableau II.1). Plusieurs facteurs de stress ont été utilisés: la privation de nourriture, privation d'eau, nage forcée, la lumière clignotante, l'isolement, la litière humide et la litière humide à 4°C. Le stress a été appliqué à des moments variables d'un jour à l'autre afin de minimiser sa prévisibilité. Les rats contrôles ont été conservés intacts dans leurs cages pendant 40 jours, ne recevant que les soins d'habitude, de la nourriture et de l'eau.

II.2.5. Administration du Polyphénol E

Le Polyphénol E (PolyE) est un mélange pharmaceutique phytothérapeutique qui contient au moins cinq catéchines différentes: épicatechine, galloocatechine gallate, l'épigalloocatechine, gallate d'épicatechine, et l'épigalloocatechine-3-gallate (EGCG), avec EGCG étant le plus abondant (**Yun et al., 2001**).

Dans cette étude, les animaux stressés ont été exposés à deux doses croissantes de Polyphénol E. Un groupe CMS reçoit une dose de 5g/"L" d'eau (PolyE1) et un autre groupe reçoit la dose de 10 g / "L" (Poly E2). Le Polyphénol E a été obtenu à partir de l'alimentation Techno Tokyo (Tokyo, Japon).

II.2.6. Gain de poids corporel

Les poids corporels ont été mesurés chaque semaine durant la procédure du CMS. Le gain de poids corporel a été calculé comme étant la différence entre le poids du jour zéro et le jour x du CMS.

1. Lotissement des rats

Contrôle (Basal) n=08	CMS (40 jours) n=08	CMS+Poly1 (40 jours) n=08	CMS+Poly2 (40 jours) n=08
--------------------------------------	------------------------------------	--	--

2. Test de mesure de la dépression

Croix surélevée	Nage forcées	Anhédonie	Poids corporel
------------------------	---------------------	------------------	-----------------------

3. Sacrifice des animaux

Récupération du sang (Dosage hormonal de la testostérone) par ELISA)	Récupération des organes (Poids relatifs du cerveau, testicule et surrénale)
---	---

Figure II.1 : Protocole expérimental

II.2.7. Etude comportementale

II.2.7.1. Test du labyrinthe surélevé

Le plus mase test (Montgomery, 1955) est utilisé pour mesurer le degré d'anxiété. Ce dispositif, en forme de croix est surélevé de 50 cm au-dessus du sol. Il comporte quatre bras ($L = 50 \text{ cm} \times l = 10 \text{ cm}$) opposés deux à deux ; deux de ces bras sont fermés par des parois de 49 cm de haut tandis que deux autres sont ouverts et entourés de baguettes de Plexiglas de 0,5 cm de haut. Les bras sont reliés par une plate-forme centrale ($10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$). Les rats sont placés au centre du dispositif, face à un bras ouvert, et laissés libres de l'explorer pendant 5 min (300sec). Ce dispositif est surmonté d'une caméra vidéo permettant d'enregistrer le comportement de l'animal pendant la durée du test.

II.2.7.2. Test de la nage forcée

La nage forcée (*Porsolt et al., 1977*) est une méthode d'exploration de l'effet antidépresseur d'une molécule et qui évalue le désespoir comportemental lors d'une nage forcée. Le dispositif de ce test est un aquarium de plexiglas transparent [$54 \text{ cm} \times 34 \text{ cm} \times 60 \text{ cm}$] rempli d'eau (26°C) jusqu'à une profondeur de 40cm. Il consiste à placer un rat dans de l'eau dont il ne peut sortir. Le rat commence par nager vigoureusement et à tenter de passer par-dessus bord ; puis il renonce et s'immobilise par périodes plus ou moins longues au cours desquelles il ne fait que les mouvements qui lui permettent de tenir la tête hors de l'eau. Les rats sont soumis à deux essais au cours de laquelle ils sont forcés de nager, et à partir de laquelle ils ne peuvent échapper. Le premier essai dur 15 minutes. Puis, après 24 heures, un deuxième essai est effectué. L'épreuve est filmée pendant 5min (test) le temps de nage, le temps d'escalade et le temps d'immobilité seront calculés.

II.2.8. Collecte des organes et des échantillons sanguins

Les prélèvements sanguins se font par voie rétro-orbitaire à l'aide d'un tube capillaire le matin entre 08h et 10h. Le sang est recueilli dans des tubes héparinés puis centrifugés à 5000 tours /minute. Le sérum est aliquoté en trois fractions dans des tubes Eppendorf puis mis au congélateur jusqu'au moment du dosage hormonal de la testostérone plasmatique.

Au terme de l'expérimentation, les rats ont été sacrifiés sous une légère anesthésie à l'éther. Les testicules, les surrénales et le cerveau 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.2.9. Dosage de la testostérone par méthode 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.

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.2.10. Analyse statistique des résultats

Le Graph Pad Prism 5 pour Windows version 5.01 a été utilisé pour faire l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les résultats ont soumis à une analyse de la variance ANOVA1 ou ANOVA2 suivie par le test *post hoc* de Newman et Keuls ou Benferroni. Les résultats ont été considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

II.3. RÉSULTATS

II.3.1. Effet de la CMS et CMS + Poly E sur le comportement dépressif-like (Nage forcée)

L'analyse de variance ANOVA1 a été réalisée afin de comparer les moyennes des différents groupes Contrôle, CMS, CMS+PolyE1 et CMS+PolyE2 au cours de la nage forcée (immobilité, escalade et nage). Ce test est suivi de Benferroni *post hoc* test dans le cas où l'ANOVA nous signale une différence significative entre les moyennes des différents groupes.

Le CMS a induit un comportement dépressif-like attesté par une augmentation significative du temps d'immobilité dans la FST (contrôle vs CMS: $t = 3,404$; $p < 0,05$). En revanche, le traitement des rats stressés par le Poly E produit un effet antidépresseur-like expliqué par la réduction des temps d'immobilité (contrôle vs CMS+PolyE1: $t=9,844$, $p < 0,0001$; contrôle vs CMS+PolyE2: $t=5,674$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + Poly E1: $t = 13,25$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + Poly E2: $t = 9,078$; $p < 0,0001$).

Nous avons également constaté un effet significatif du CMS sur le temps d'escalade (R au carré = 0.8958, $F = 80,23$; $p < 0,0001$). Benferroni test indique que la CMS provoque une diminution significative du temps d'escalade chez les animaux stressés par rapport au groupe contrôle (contrôle vs CMS: $t = 3,826$; $p < 0,001$). Le temps d'escalade augmente chez le groupe CMS + Poly E1 par rapport au contrôle et CMS groupes (contrôle vs CMS + Poly E1: $t = 7,835$; $p < 0,0001$); (contrôle + vs CMS Poly E2: $t = 9,475$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + Poly E1: $t = 11,66$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + Poly E2: $t = 13,30$; $p < 0,0001$). Le traitement de animaux a aussi un effet sur le temps de nage (R au carré = 0,8207; $F = 42,73$ $p < 0,001$). Benferroni test indique que la CMS + Poly E induit une augmentation significative du temps de nage comparativement aux animaux stressés (CMS vs CMS + Poly E1: $t = 10,55$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + Poly E2: $t = 4.134$; $p < 0,001$).

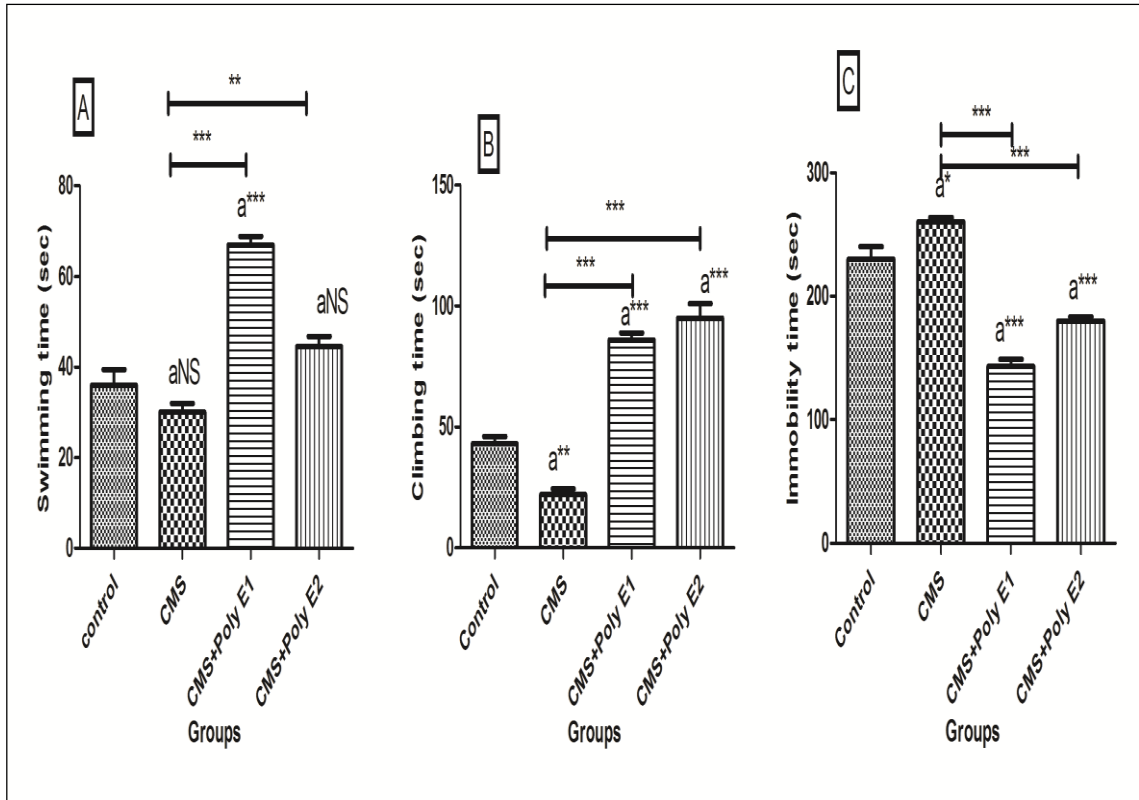


Figure II.2: Effet du CMS et CMS + Poly E sur le comportement du type dépressif au test de la nage forcée (A: Piscine temps, B: Escalade temps, C: Temps d'immobilité). L'analyse de la variance et le test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les groupes l'un à l'autre (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

II.3. 2. Effets comportementaux de type anxieux du CMS et CMS + Poly E dans le test du labyrinthe en croix surélevée

L'analyse de variance ANOVA1 a été utilisée pour étudier les effets comportementaux de type anxieux dans l'*Elevated plus maze* (EPM). L'analyse du temps passé dans les bras ouverts a révélé un effet significatif des traitements ($R^2 = 0,9276$; $F = 119,7$; $p < 0,0001$). Le traitement (CMS et Poly E) a également un effet sur le nombre d'entrées dans les bras ouverts ($R^2 = 0,8362$; $F = 47,65$; $p < 0,0001$) et le temps d'immobilité ($R^2 = 0,9413$; $F = 149,7$; $p < 0,0001$).

Les rats stressés passent moins de temps dans les bras ouverts, et il y viennent le moins souvent. Ceci démontre que le CMS conduit à une augmentation de l'anxiété chez les animaux. Le CMS induit une diminution de l'activité locomotrice. Inversement le Poly E, quelle que soit la dose, entraîne une augmentation de la locomotion.

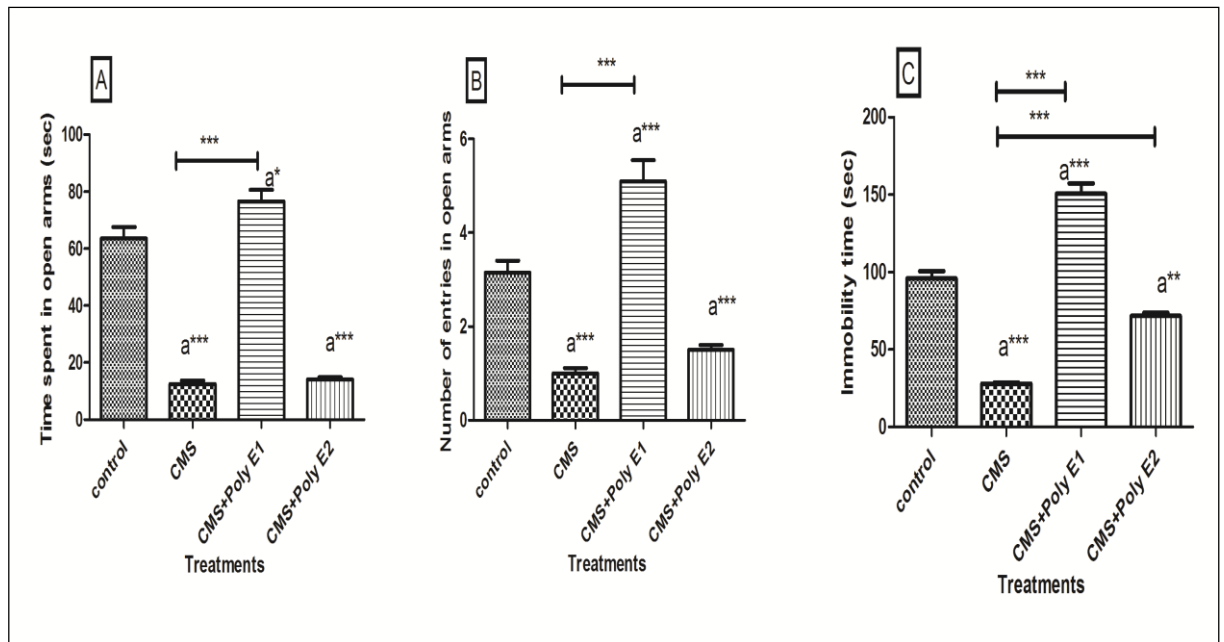


Figure II.3: Effets du CMS et CMS + Poly E sur le comportement de type anxiété au test labyrinthe en croix surélevé (A: Temps passé dans les bras ouverts ("s"), B: Nombre d'entrées dans les bras ouverts, C: Temps d'immobilité ("s"). L'analyse de la variance a été utilisée pour comparer les différents groupes, et le test de Benferroni de comparaison multiple ont servi pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

II.3.3. Évolution temporelle du gain du poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + Poly E

L'ANOVA à 2 critères de classification indique que le traitement n'a pas d'effet ($F = 1,752; p = 0.1995$), par contre, le facteur jours a un effet ($F = 18,17; p < 0,0001$). Le CMS induit un net effondrement du poids corporel, à la fin de l'expérience (jour 50). Cette diminution est statistiquement non significative.

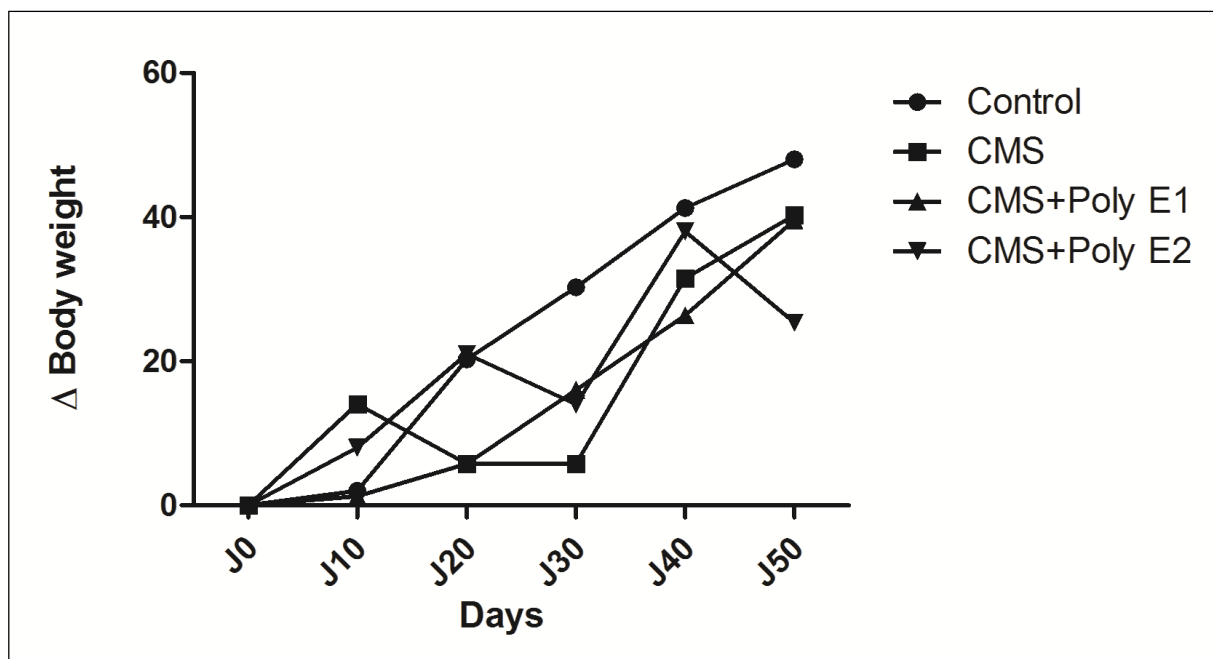


Figure II.4: Évolution temporelle du poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + Poly E. Le traitement par l'ANOVA à 2 facteurs (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les traitements (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

II.3.4. Évolution temporelle de la prise alimentaire (g / 100 g de poids corporel) chez les groupes CMS et Poly E

L'ANOVA 2 indique une différence significative sur la prise alimentaire (contrôle vs CMS) aux jours (J03, J08, J22 et J31) ($p < 0,001$). La comparaison Contrôle vs CMS + Poly E1 signale une différence significative en jours (J0, J03, J08, J16) ($p < 0,001$) et J22 ($p < 0,05$). À propos du groupe (contrôle vs CMS + Poly E2) on note une différence significative en jours (J0, J03, J08) ($p < 0,001$) et jours (J22, J31) ($p < 0,001$). La comparaison CMS vs CMS + Poly E1 présente une différence de signification en jours (J0, J03, J08, J16, J22) ($p < 0,001$). Pour ce qui est du CMS vs CMS+PolyE2, nous avons souligné une différence en jours (J0, J03, J08 et J31) ($p < 0,001$). Enfin, le groupes CMS + PolyE1 vs CMS + PolyE2, une différence significative tous les jours de traitement a été signalée (J0, J03, J08, J16, J22, J31) ($p < 0,001$).

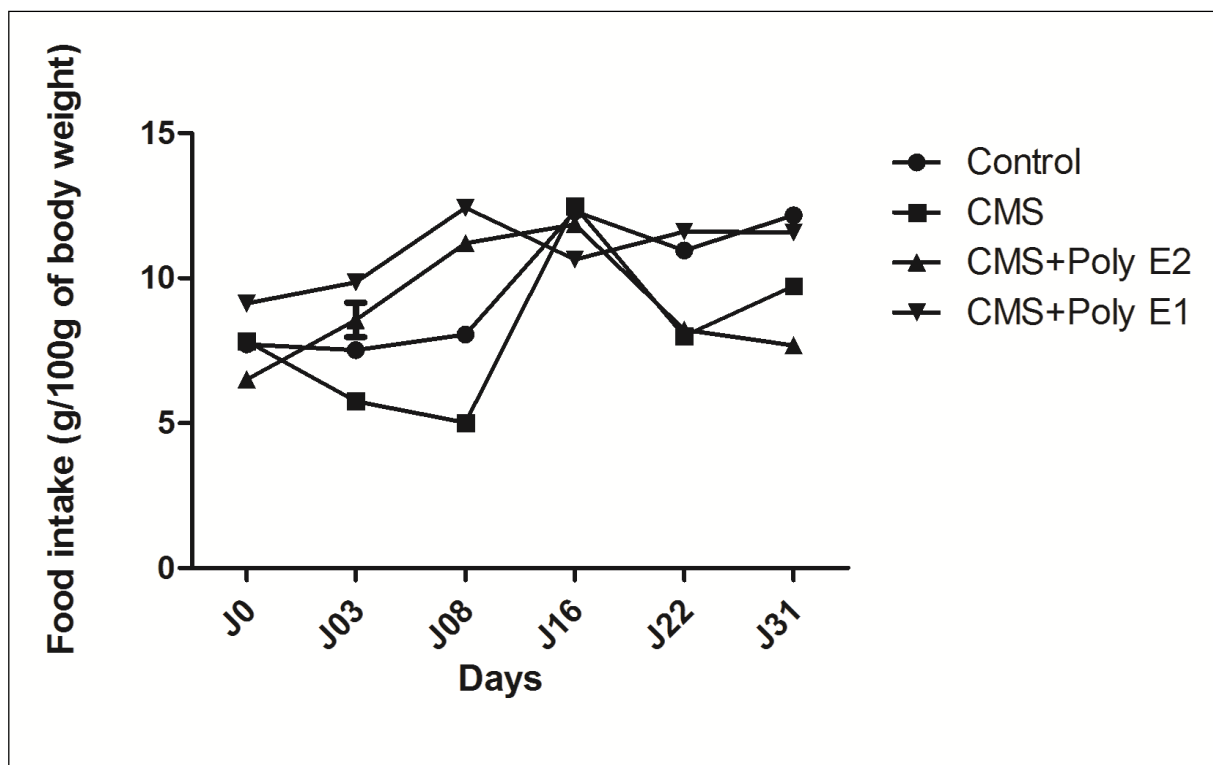


Figure II.5: Effets du CMS et le Poly E sur l'apport alimentaire (g / 100 g de poids corporel) mesuré dans CMS et CMS + Poly E. Le traitement par l'ANOVA (X jours) et post-test Benferroni ont été utilisés pour comparer chaque colonne (traitements) à toutes les autres colonnes (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

II.3.5. Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans le CMS et CMS + PolyE

L'ANOVA2 a indiqué un effet significatif du traitement ($F = 342,1$; $p < 0,0001$), jours ($F = 353,3$; $p < 0,0001$) et une interaction ($F = 177,8$; $p < 0,0001$). Le post-test de Benferroni été utilisé pour comparer les traitements. Le test a révélé une différence significative entre CMS, CMS + Poly E1 et E2 CMS + Poly les jours J0, J21 et J34.

Table II.2. Test de comparaison multiple de Bonferroni. Apport de saccharose (%) dans les groupes de la CMS et Poly E (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Jours	00	11	21	34	39
Control vs CMS (t, p)	3.036 *	1.14 ns	22.58 ***	11.17 ***	23.47 ***
Control vs CMS+Poly E1 (t, p)	4.416 ***	1.14 ns	25.72 ***	30.82 ***	1.74 Ns
Control vs CMS+ Poly E2 (t, p)	3.195 **	1.486 ns	0.052 Ns	5.457 ***	19.65 ***
CMS vs CMS+Poly E1 (t, p)	1.38 Ns	0 ns	3.135 *	19.66 ***	21.73 ***
CMS vs CMS+ Poly E2 (t, p)	0.1588 Ns	0.345 ns	22.64 ***	5.708 ***	3.812 **
CMS+Poly E1 vs CMS+ Poly E2 (t, p)	1.221 Ns	0.345 ns	25.77 ***	25.37 ***	17.91 ***

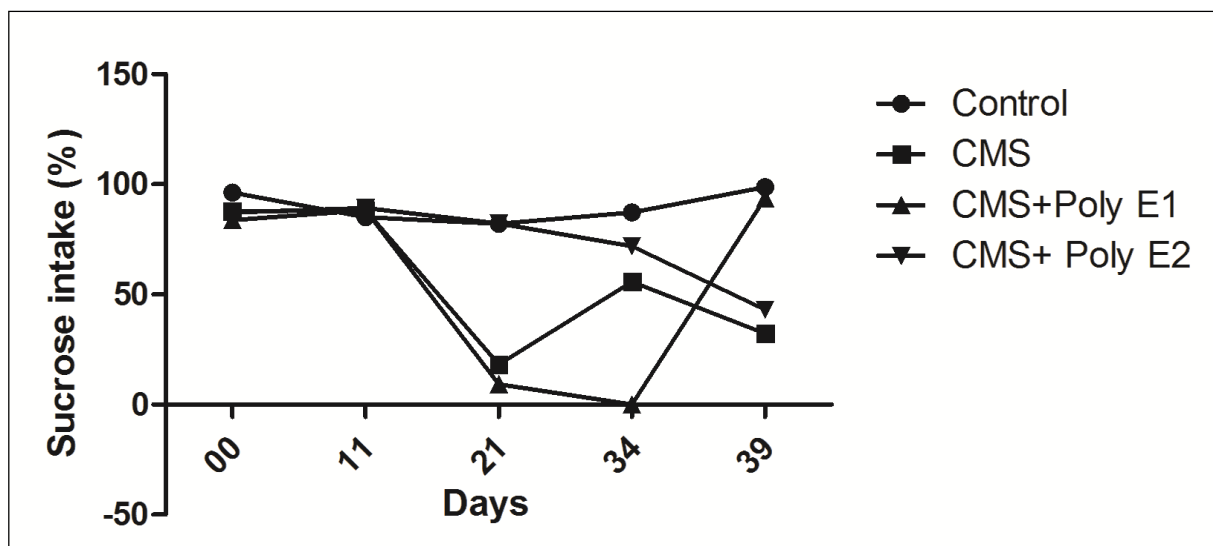


Figure II.6: Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans les groupes de la CMS et Poly E. Deux voies de traitement par l'ANOVA X jours. Le post-test de Benferroni a été utilisé pour comparer les moyennes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

II.3.6. Variations des niveaux de la testostérone chez les rats soumis au CMS et CMS + Poly E.

Le CMS a diminué de manière significative les niveaux relatifs de testostérone ($F = 21,95$; R au carré = $0,7016$; CMS vs contrôle: $q = 10,2$; $p < 0,0001$). Cette diminution est inversé par un traitement Poly E1 (CMS + Poly E1 vs contrôle: $q = 2,846$; NS).

II.3.7. Variations du poids relatif des organes (cerveau, testicules et surrénales) chez les rats soumis au CMS et CMS + Poly E.

Le post-test de comparaison multiple de Newman-Keuls a révélé des différences statistiquement significative (Figure II.7).

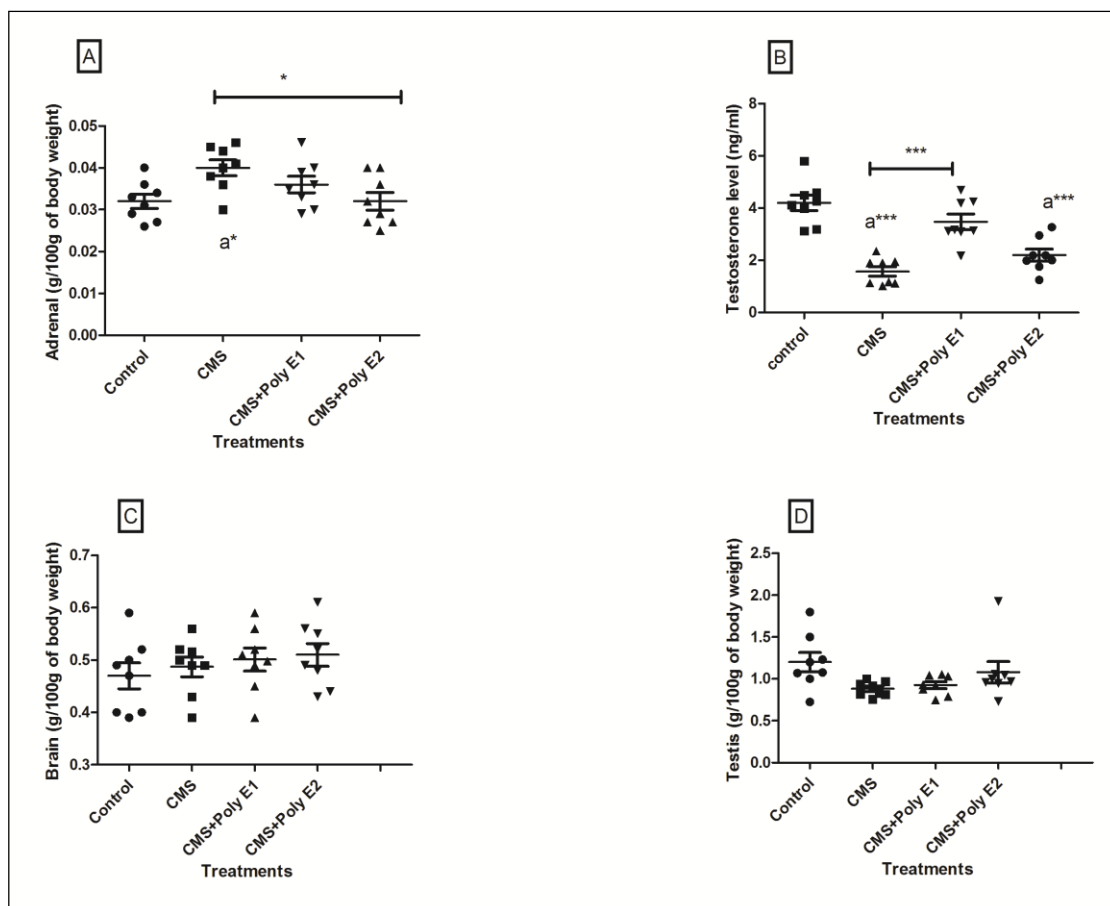


Figure II.7: Variation du poids relatif des organes (g / 100g de poids corporel) (A: surrénales, C: Cerveau, D: Testicules) et du niveau de testostérone (ng / ml) (B) chez les animaux soumis au CMS et CMS+PolyE. L'analyse de la variance et le test post hoc, test de multiple comparaison de Newman-Keuls ont été utilisés (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

II.4. DISCUSSION

Le modèle CMS a été largement utilisé par de nombreux chercheurs, les résultats ont montré que les rongeurs exposés à un stress chronique réduisent leur consommation de saccharose après quelques semaines (**Willner., 2005**). Nos résultats confirment cette observation lorsque le stress chronique pendant 40 jours génère chez les animaux des effets dépressogène-*like* et anxiogène-*like* manifestés par la réduction des temps d'immobilité (dans le test de la nage forcée)(Figure II.2), la diminution de la locomotion, du temps passé et le nombre d'entrées dans le bras ouverts dans le test du labyrinthe en croix surélevé (Figure II.3), et la perte de l'apport du saccharose (au test de préférence sucrée saccharose) (Figure II.6) appelé comportement d'anhédonie. Ces mesures ont démontré que le CMS provoque une dépression. Ce qui dénote de la faisabilité de notre modèle de la dépression. Ces résultats comportementaux sont corroborés aux autres paramètres hormonaux, en l'occurrence les taux de testostérone plasmatiques, et pondéraux (poids relatifs des glandes surrénales, du cerveau et des testicules) (Figure II.7). Le CMS provoque une augmentation significative du poids des surrénales accompagnée d'une réduction du taux de testostérone. Contrairement, l'administration de Poly E1 à une dose (5g / "L") chez le groupe CMS semble inverser le taux de testostérone et le poids des surrénales. Il provoque un comportement antidépresseur et anxiolytique-*like*.

Une attention croissante est accordée au cours de ces dernières années pour expliquer l'origine de la baisse de testostérone chez les animaux stressés. Le mécanisme par lequel ils sont affectés n'a pas encore été clarifié. Néanmoins on sait que le stress est associé à des effets néfastes sur la fonction reproductrice mâle et qu'il augmente la production d'espèces réactives de l'oxygène dans l'appareil reproducteur mâle (**Garcia-Diaz et al., 2015**). Dans cette étude, il a été montré que le stress chronique au froid provoque une diminution du poids des testicules, associée par l'accroissement des espèces réactives de l'oxygène et de la production de la peroxydation lipidique à 20, 40 et 50 jours. L'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et de la glutathion peroxydase (GPx) a diminué tout au long de la durée de stress chronique et l'activité de la catalase a diminué après 40 et 50 jours, et a augmenté à 20 jours, et a augmenté au bout de 20 jours. L'expression de cuivre / zinc superoxyde dismutase et de la catalase n'a pas été modifiée, mais l'expression de phospholipides hydroperoxyde glutathion peroxydase a diminué à 20 jours. Ces résultats suggèrent que le stress chronique au froid provoque un déséquilibre aigu du statut redox, avec une faible activité enzymatique, mais sans pour autant

modifier leur expression. En outre, la corticostérone a augmenté, tandis que la testostérone a diminué.

Le stress psychologique active l'axe HPA qui aboutit à la libération croissante de glucocorticoïdes. De nombreuses études ont déduit que les glucocorticoïdes endogènes jouent un rôle important dans les troubles pathologiques induits par le stress (**Bratt et al., 2001**). Pendant longtemps, il a été reconnu que la réduction de la testostérone pourrait être associée à un dysfonctionnement de l'axe HPA. En effet, l'axe gonadotrope est inhibé à tous les niveaux par les différents composants de l'axe HPA (**Rivier et al., 1986; Rabin et al., 1988; Frih et al., 2010; Rabin et al., 1988**). Au niveau de l'hypothalamus, la CRH (Corticotropin Releasing Hormone) inhibe la gonadolibérine (GnRH) dans le noyau arqué hypothalamique. Cet effet pourrait être également médié par la β -endorphine qui provient de la scission de proopiomélanocortine (POMC) sous l'effet du CRH hypothalamique (**Chrousos et al., 1998**). En outre, les glucocorticoïdes exercent des effets inhibiteurs sur les neurones hypothalamiques à GnRH, et sur les gonades provoquant une diminution de la sensibilité des tissus cibles aux stéroïdes sexuels (résistance périphérique) (**Rabin et al., 1988**).

Dans notre étude, nous avons examiné les effets neuropharmacologiques de Poly E dans le test de la nage forcée (FST)(Figure II.3). Ce dernier est un modèle animal de la dépression. C'est une situation stressante aversive où les rats ne peuvent pas s'échapper, et produit l'immobilité (**Porsolt et al., 1977**). Au cours de la FST, les rats montrent un comportement actif (nage et l'escalade), ainsi que passif (l'immobilité). Les molécules qui diminuent la durée d'immobilité dans la FST sont considérées comme des antidépresseurs efficaces (**Porsolt et al., 1977**). Nous avons constaté que le Poly E1 (5g / "L") diminue le temps d'immobilité. Ceci indique un effet antidépresseur de ces médicaments. Cependant, cette diminution du temps d'immobilité peut être en faveur d'une augmentation du temps de la nage. Théoriquement, lorsqu'une molécule agit dans ce sens, c'est la voie sérotoninergique qui est impliquée (**Detke and Lucki, 1995; Frih et al., 2010**). Le Poly E1 exerce son effet antidépresseur-like en agissant sur cette voie.

L' *Elevated Plus Maze* test est l'un des modèles les plus répandus pour mesurer l'anxiété. L'augmentation du nombre d'entrées et le temps passé dans les bras ouverts sont considérés comme les indices représentant le plus de l'activité de type anxiolytique-like. Dans ce dispositif, les rats préfèrent normalement passer beaucoup de temps dans les bras fermés. Ce comportement semble refléter une aversion pour les bras ouverts, qui est générée par la peur des espaces ouverts. Les médicaments qui augmentent l'exploration des bras

ouverts sont considérés comme des anxiolytiques et l'inverse est vrai (**Nic Dhonnchadha et al., 2003**). Au test du labyrinthe (Figure II.3), nous avons trouvé que le Poly E1 exerce un effet anxiolytique-*like*. Ces effets comportementaux peuvent avoir plusieurs origines. Soit le Poly E1 pourrait agir directement en changeant l'état d'oxydation, ou que ses effets soient médiés par la corticostérone et / ou la testostérone.

Ainsi, des études ont montré que la testostérone joue un rôle important dans les troubles du cerveau associée au stress. Tout d'abord, les niveaux de testostérone sont positivement corrélés à une déficience cognitive (**Pintana et al., 2015**). En outre, il apparaît que la testostérone a exercé des effets bénéfiques dans le fonctionnement du cerveau, y compris la prévention de la mort des cellules neuronales, équilibre le stress oxydatif cérébral et l'activité antioxydante, l'amélioration de la plasticité synaptique et impliquant la formation cognitive (**Pintana et al., 2015**). En raison de sa nature lipophile, la testostérone traverse facilement la barrière hémato-encéphalique et agit directement dans le cerveau par voie génomique. En effet, dans une étude très récente par **Filová et al. (2015)**, il a été montré, chez le rat gonadéctomisé que la testostérone a un effet génomique non rapide par rapport à l'estradiol qui semble avoir un effet non-génomique rapide. Dans une autre étude, il a été signalé que les deux testostérone et l'estradiol présentent des effets anxiolytique et antidépresseur-*like* chez les rats mâles gonadectomisés, tout en régulant de façon similaire les médiateurs critiques de ces comportements, suggérant des mécanismes sous-jacents communs (**Carrier et al., 2015**). Dans cette étude, il est suggéré que les effets protecteurs de la testostérone sont médiés en partie par son aromatisation dans le gyrus dentelé (**Carrier et al., 2015**). Les hormones corticostéroïdes régulent le temps d'immobilité dans la FST (**Mitchell et Meaney, 1991**). **Baez et Volosin (1994)** ont noté une augmentation de la corticostérone accompagnée d'une augmentation du temps d'immobilité dans le test de la nage forcée. D'autres résultats montrent que la surrénalectomie chirurgicale a diminué le temps d'immobilité (**Veldhuis et al., 1985 ; De Kloet et al., 1988 ; Mitchell et Meaney, 1991**). Cependant, l'administration de la corticostérone (1 mg / kg) le premier jour de l'épreuve (après première FST), augmente la deuxième journée d'essais le temps d'immobilité (deuxième FST). La dexaméthasone (dose-dépendante) a aboli cet effet (**De Kloet et al., 1988 ; Mitchell et Meaney, 1991**). La métyrapone (120 mg / kg) (blocs 11-bêta-hydroxylase) injectée 3 heures avant le premier FST réduit significativement le temps d'immobilité. Cet effet pourrait être dû à la corticostérone (dose-dépendante).

Il existe des preuves expérimentales montrant que les hormones gonadiques stéroïdes testostérone et l'estradiol ont des effets neuroprotecteurs (Veiga *et al.*, 2004). Par exemple, ces stéroïdes inhibent la neurodégénérescence induite par le stress, principalement dans l'hippocampe (Elder *et al.*, 2006 ; Vollmayr *et al.*, 2007), une structure du cerveau impliquée dans l'étiologie de la dépression (Bremner *et al.*, 2000). Il a été suggéré que la dépression est associée à une réduction de la neurogenèse des cellules de l'hippocampe. Ainsi, les rats stressés qui ont développé une anhédonie pourraient présenter des changements plastiques dans le cerveau. En effet, des recherches récentes indiquent que la résilience au CMS est associée à l'expression de protéines alpha et bêta SNAP dans le hippocampe et à l'expression de gènes impliqués dans la signalisation de l'hippocampe (Bergström *et al.*, 2007), ce qui suggère que le développement de l'anhédonie après l'exposition au CMS est lié à une dépréciation de la neurogenèse hippocampique ou voies de plasticité cellulaire (Bergström *et al.*, 2007; Bisgaard *et al.*, 2007).

Chez les animaux âgés, les altérations du cerveau qui conduisent à une plus grande capacité de développer une dépression expérimentale pourraient être expliqués aux faibles niveaux de testostérone et à l'œstradiol liés à l'âge; ce qui altèrent les processus biologiques liés à la neuroplasticité et à la neuroprotection (Smith *et al.*, 2005). Dans ce même ordre d'idée, certaines études ont montré une diminution, âge-dépendante, de la production de facteurs neurotrophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau, *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Hayashi *et al.*, 2001), qui à son tour est modulée par eostradiol (Cavus et Duman, 2003) et une réduction, en la fonction de l'âge, de la neurogenèse hippocampique, effectivement rétablie par surrénalectomie (Cameron et McKay, 1999). En outre, il a été observé que l'œstradiol stimule la neurogenèse de l'hippocampe (Tanapat *et al.*, 1999). Des études cliniques montrant que les niveaux bas de testostérone sont associés à une augmentation de la capacité de développer une dépression (Yesavage *et al.*, 1985; Shores *et al.*, 2004), bien que la plupart de ces études chez les patients atteints d'hypogonadisme, les résultats appuient l'idée qu'il existe une relation inverse entre les niveaux de la testostérone et la dépression.

Comme nous l'avons souligné auparavant, que le Polyphenon E (polyE) contient au moins cinq catéchines différentes: épicatechine, gallate gallocatéchine, épigallocatéchine, le gallate d'épicatechine, et l'épigallocatéchine-3-gallate (EGCG), avec EGCG étant le plus abondant (Yun *et al.*, 2001). EGCG agit comme un anti-oxydant dans le système biologique (Choi *et al.*, 2001) et atténue la peroxydation lipidique provoquée par diverses formes de

radicaux libres (**Gau et al., 1996**). En particulier, l'EGCG réduit la mort cellulaire neuronale causée par ischémie globale transitoire (**Lee et al., 2000**), neurotoxicité induite par la β Amyloïde et les dommages des cellules neuronales (**Bae et al., 2002**), qui sont tous associés à une augmentation du stress oxydatif. Il a été rapporté que l'administration à long terme de catéchines du thé vert permet de réduire les niveaux de ROS de l'hippocampe et la peroxydation lipidique et augmente le pouvoir d'anti-oxydation chez le rat. Ces changements ont démontré l'amélioration de déclin cognitif lié à l'âge chez les rats (**Haque et al., 2006**).

Le métabolisme des catéchines du thé vert a été étudié chez l'animal (**Kohri et al., 2001**) et chez des sujets humain (**Lee et al., 2003 ; Kuriyama et al., 2006**). Après administration orale, l'épigallocatechine gallate (EGCG) est détecté comme EGCG libre ou ses conjugués ou les deux à la fois ; le pic est décelée à 1-2 "h" après l'administration systémique de la dose chez le rat (**Unno and Takeo, 1995 ; Kuriyama et al., 2006**). Des études avec l'EGCG radiomarké chez la souris (**Suganuma et al., 1998**) ou le rat ont également démontré son incorporation dans le cerveau et dans d'autres organes tels que le rein, le cœur, le foie, la rate et le pancréas. EGCG a une plus forte activité anti-oxydante par rapport à soit la vitamine E ou C (**Rice-Evans, 1999**). En outre, dans la réduction de la peroxydation lipidique induite par les ions ferreux, les valeurs des concentrations inhibitrices médianes (CI₅₀) de plusieurs anti-oxydants sont les suivantes: 3,32 pM pour l'EGCG, 75,65 PM pour Trolox, 7,63 uM pour les acides lipoïques et 15,48 pM pour la mélatonine (**Nakagawa et Miyazawa, 1997; Kuriyama et al., 2006**).

Il a été rapporté par **Abdul et al. (2008)** que le volume de consommation de l'eau Poly E-mixte était d'environ 60 ml /kg/jour dans le groupe Poly E1 0,5%. De ce fait, une personne (avec un poids corporel de 50 kg) devrait boire environ 3 "L" de Poly E par jour pour obtenir des effets similaires. Cependant, les humains consomment des antioxydants (y compris les vitamines A, B, C et E ainsi que des polyphénols, etc.) à partir de diverses sources de nourriture tous les jours. Par conséquent, une quantité plus faible de 0,5% de Poly E1-mixte dans un volume d'eau peut être efficace chez l'Homme pour assurer des effets similaires. Cependant, une enquête détaillée est certainement nécessaire pour comprendre les vertus des catéchines chez les humains.

CONCLUSION

Nos résultats suggèrent que l'administration à long terme de Poly E prévient les changements de comportement négatifs probablement causés par le stress oxydatif, au moins en facilitant les défenses antioxydantes. Cependant, d'autres recherches sont nécessaires pour clarifier le mécanisme exact du Poly E qui contribue à la prévention des dommages dans le modèle de la dépression du stress chronique léger ou *Chronic Mild Stress* (CMS)

Chapitre III-
Etude des effets du Bacille de Calmette et Guérin (BCG)
chez un modèle animal de dépression:
Le stress chronique imprédictible (Chronic Mild Stress)
chez le rat mâle Wistar.

Chapitre III- Etude des effets du Bacille de Calmette et Guérin (BCG) chez un modèle animal de dépression: Le stress chronique imprédictible (*Chronic Mild Stress*) chez le rat mâle Wistar.

RESUME

L'objectif de la présente étude est d'examiner les changements comportementaux et hormonaux suite au stress chronique imprédictible ou *chronic mild stress* (CMS) (modèle animal de dépression) chez le rat mâle Wistar et d'évaluer les effets thérapeutiques d'un agent immunogène le BCG. Le programme du CMS est appliqué pendant 40 jours ; Le Bacille Calmette Guérin est administré par voie intradermique à une dose de 0.25 ml au 18^{ème} jour du CMS dans le but d'aboutir à une activation du système immunitaire innée chez des rats mâle Wistar. Les changements comportementaux sont estimés à travers la mesure de la dépression au test de la nage forcée et de l'anxiété au test du labyrinthe en croix surélevée. Le test de préférence sucrée (anhédonie) et la consommation d'aliment sont également évalués. Au terme de l'expérimentation, les poids relatives des organes (Cerveau, surrénales et testicules) sont mesurés.

Nos résultats ont montré que : le CMS génère la dépression et l'anxiété chez l'animal, au test de la nage force et au labyrinthe en croix surélevée et diminue la consommation d'eau sucrée et de l'aliment. Le traitement par le BCG agit différemment lorsqu'il est administré seul ou en association avec le CMS. Lorsqu'il est administré seul le BCG exerce un effet dépressinogènes-*like* due à l'activation du SI. Au contraire, lorsqu'il est administré chez les animaux CMS, son effet est plutôt réparateur *antidépresseur-like*. Ces effets pourraient être associés aux variations hormonales particulièrement stéroïdiennes.

Mots clés :

BCG, CMS, Anxiété, Dépression, Testostérone.

ملخص:

الهدف من هذه الدراسة هو دراسة التغيرات السلوكية والهرمونية بسبب الإجهاد المزمن أو غير متوقعة الإجهاد المزمن الخفيف) (CMS) نموذج حيواني الاكتئاب (في فئران ويستار الذكور وتقييم الآثار العلاجية المناعية ووكيل BCG يتم تطبيق برنامج CMS لمدة 40 يوما؛ ويدار [عصيات كالميت غيران] الأدمة بجرعة 0.25 مل في اليوم ال 18 من CMS من أجل أن تؤدي إلى تفعيل نظام المناعة الفطري في فئران ويستار الذكور. وتقدر التغيرات السلوكية من خلال قياس الاكتئاب في اختبار السباحة القسري واختبار من القلق في متاهة عبر مرتفعة. ويفضل أن يتم تقييم أيضا اختبار الحلو (انعدام التلذذ) واستهلاك العلف. في نهاية التجربة، تم قياس أجهزة الوزن النسبية (الدماغ والغدد الكظرية والخصيتين). أظهرت نتائجنا أن CMS يولد الاكتئاب والقلق لدى الحيوانات لاختبار السباحة القوة والمتاهة عبر المرتفع ويقلل من استهلاك الماء والسكر والمواد الغذائية. علاج BCG تنصرف بشكل مختلف عندما تدار وحدها أو بالاشتراك مع CMS. عندما تدار وحدها BCG يمارس *dépressinogènes* مثل تأثير بسبب تفعيل نظام المناعة [IS] على العكس من ذلك، عندما يدار للحيوانات CMS ، وتأثيره هو منعش بدلا-المضادة للاكتئاب مثل يمكن أن تترافق هذه الآثار مع التغيرات الهرمونية وخاصة الستيرويد.

الكلمات الرئيسية:

BCG عصيات كالميت غيران ، CMS،القلق، الاكتئاب، هرمون تستوستيرون.

Abstract:

The objective of this study is to examine the behavioral and hormonal changes due to chronic stress or unpredictable chronic mild stress (CMS) (animal model of depression) in the male Wistar rats and evaluate the therapeutic effects of an agent immunogenic BCG. The CMS program is applied for 40 days; The Bacille Calmette Guerin is administered intradermally at a dose of 0.25 ml in the 18th day of the CMS in order to lead to activation of the innate immune system in male Wistar rats. The behavioral changes are estimated through measuring the depression in the forced swim test and the test of anxiety in an elevated cross labyrinth. Preferably the sweet test (anhedonia) and feed intake are also evaluated. At the end of the experiment, the relative weight organs (brain, adrenal glands and testes) were measured.

Our results showed that: the CMS generates depression and anxiety in animals to test the strength swim and maze elevated cross and reduces sugar water consumption and food. The BCG treatment acts differently when administered alone or in combination with the CMS. When administered alone BCG exerts dépressinogènes-like effect due to the activation of the IS. On the contrary, when it is administered to animals CMS, its effect is rather refreshing antidepressant-like. These effects could be associated with hormonal changes particularly steroid.

Keywords:

BCG, CMS, anxiety, depression, testosterone.

III.1. Introduction

Les relations complexes entre l'inflammation et la dépression ont attiré cette dernière décennie l'attention des chercheurs dans tous les domaines de recherche de par ses applications multiples. Les études précédentes indiquent que la neuroinflammation et la dépression partagent les voies neuroanatomiques et des substrats neurobiologiques communes, qui pourraient expliquer la vulnérabilité accrue à la neuroinflammation chez les patients dépressifs et vice versa (**Kubera et al., 2011**).

La relation entre la dépression et la neuroinflammation est toujours une question de discussion et n'a pas été entièrement comprise. Les événements de vie stressants, des facteurs de stress externes et/ou des facteurs de stress internes, en l'occurrence des conditions inflammatoires, sont largement reconnues comme un facteur prédisposant et précipitant la dépression et par conséquent sont impliquées dans l'étiologie de la dépression (**Maes, 1995 ; Maes, 2008 ; Maes et al., 1995 ; Maes et al., 2009; Anisman, 2009 ; Miller, 2009**).

Le modèle animal de stress chronique imprédictible (CMS) est l'un des modèles classiques de dépression présenté par **Willner et al. (1987)**. Le paradigme se compose de plusieurs facteurs de stress qui sont analogues à ceux liés aux humains. Dans ce paradigme, des animaux sont soumis à une variété de stress chaque jour. Après plusieurs semaines, les animaux montrent une diminution de la consommation des solutions sucrée agréable au goût, connue sous le nom d'anhédonie, qui est le caractère central de la dépression (**Willner, 1997**).

Chez les animaux et les humains, les voies inflammatoires systémiques provoquent le comportement de maladie, y compris des comportements tels que l'anhédonie, la réduction d'activité locomotrice, l'exploration et toilettage, la léthargie, l'anxiété, le hypersomnies, l'anorexie, la perte de poids, le hyperalgésie et le manque de se concentrer ou les perturbations de mémoire (**Holmes and Miller, 1963 ; Hart, 1988 ; Maier et al., 1993 ; Kelley et al., 2003 ; Yirmiya, 1996 ; Exton, 1997 ; Qin et al., 2007**).

L'inflammation induite par le BCG est considérée comme modèle de dépression immunodépendant (cellule T), et les symptômes centraux constituent le comportement de maladie, à savoir les changements comportementaux qui suivent l'immuno-réaction (**Garcia-Bonacho et al., 2000**). Une des caractéristiques du comportement négatif obtenu expérimentalement est le changement du rythme circadien de libération de plusieurs hormones se produisant 18 jours après injection de bacille Calmette et Gerin chez les rats.

Le but de notre étude est d'étudier la réactivité neurocomportementale chez deux modèles

animaux de dépression, en l'occurrence le CMS et le BCG, à travers de la mesure de l'évolution du poids, de l'activité locomotrice (au test des champs ouverts), de l'anxiété (au test de labyrinthe en croix surélevée): Le CMS et combiné CMS + BCG et de déterminer la possibilité de développer des symptômes comme dépressive-like chez des rats. On se basant sur des données bibliographiques et des études précédentes dans ce domaine de recherche, nous avons tenté d'expliquer les mécanismes régulateurs impliqués dans chaque situation.

III.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

III.2.1. Animaux d'expérience

Des rats Wistar mâles adultes (achetés auprès de l'Institut Pasteur, Alger), pesant entre 200 et 300 g ont été utilisés. Les rats ont été logés dans des cages en polypropylène. La litière composée de copeaux de bois est changée tous les deux jours. Les conditions ambiantes d'élevage sont bien contrôlées; la photopériode est de 12 "h" de lumière et 12"h" d'obscurité (lumière allumée à 07:00 du matin) et la température est de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. L'eau et la nourriture sont servies *ad libitum*. Les animaux sont manipulés soigneusement 3 à 5 minutes par jour par l'expérimentateur avant le début de l'expérience.

Après une période d'acclimatation de 15 jours, 32 rats mâles ont été divisés en 4 groupes:

Un groupe d'animaux **contrôle** (n = 8).

Un groupe de 8 rats soumis à un stress chronique pendant 6 semaines (**CMS**).

Un groupe de 8 rats stressés et traités avec le BCG à la dose de 0.25mg / kg de poids corporel, symbolisé **CMS +BCG**

Un groupe de 8 rats traités à la dose de 0.25mg / kg, symbolisé **BCG**

Le BCG est administré au 18ème jour du *Chronic Mild Stress* par voie intradermique

Le protocole expérimental du CMS est tracé dans le tableau I.

Tableau II.1 : Programme du stress chronique imprédictible (CMS) appliqué.

Jour	Facteur de stress	Durée
1	Privation d'eau	24 h
2	Privation de nourriture	24 h
3, 4, 5	Isolement	24 h
6	Lumière clignotante	3 h
7	Privation de nourriture	24 h
8	Nage forcée	10 min
9	Litière humide	1 h
10	Privation d'eau	24 h
11, 12	Aucun stress	-
13	Litière humide + 4°C	1 h 30
14	Lumière clignotante	2 h 30
15	Privation de nourriture	24 h
16	Nage forcée	15 min
17, 18, 19	Isolement	24 h
20	Privation d'eau	24 h
21	Privation de nourriture	24 h
22	Lumière clignotante	3 h
23	Litière humide	1 h
24, 25	Isolement	24 h
26	Litière humide + 4°C	1 h 30
27	Nage forcée	10 min
28	Lumière clignotante	3 h 30
29	Aucun stress	-
30	Privation de nourriture	24 h
31	Litière humide	1 h
32	Lumière clignotante	3 h
33	Privation d'eau	24 h

Les comportements liés à la dépression ont été évalués avant (état basal) et après la procédure CMS par le labyrinthe en croix surélevée (*Elevated plus maze test: EPM*) (pour mesurer le degré d'anxiété) et le test de la nage forcée (*Forced swimming test: FST*) (Pour mesurer le degré de dépression). Le protocole expérimental est montré dans la Figure 01. Le protocole expérimental a été approuvé par le Comité scientifique de la Faculté des Sciences de l'Université BADJI Mokhtar-Annaba qui est compatible avec les principes de la santé animale (**NIH Publication n ° 85-23, révisé 1985**).

III.2.2. Mesure de la consommation d'aliment

Cf. Chapitre II.2.2.

III.2.3. Test de préférence sucrée (anhédonie)

Cf. Chapitre II.2.3

III.2.4. Application du stress chronique (CMS)

Cf. Chapitre II.2.4

III.2.5. Administration du BCG

Le vaccin BCG lyophilisé provient de la culture de la sous-souche Connaught du bacille Calmette Guérin, une souche atténuée du *Mycobacterium bovis* Karlson & Lessel, 1970 en suspension dans du glutamate monosodique. Les cultures de BCG sont répandues sur un milieu de croissance de Sauton, ensuite mélangées avec du glutamate monosodique lyophilisé. Les cultures du BCG sont viables après reconstitution. Le vaccin BCG est fourni en fioles multi-doses accompagnées d'un diluant composé d'une solution saline stérile tamponnée avec du phosphate contenant 0,025% de polysorbate 80. La concentration du vaccin reconstitué est de 8×10^5 à 32×10^5 unités formant des colonies (UFC) par dose pour adulte de 0,1 mL (= 0,1 mg BCG), équivalent à 4×10^5 à 16×10^5 UFC par dose pour enfant de 0,05 mL (= 0,5 mg BCG).

La dose de BCG (10^7 UFC / rat) a été sélectionnée en fonction des indications fournies par **Moreau et al. (2008)**. Le vaccin a été administré par voie intradermique (ID) au 18^{ème} jour de CMS dans un volume de 0.02 ml / rat. Les rats témoins n'ont reçu aucune injection.

III.2.6. Gain de poids corporel

Cf. Chapitre II.2.6

1. Lotissement des rats

Contrôle BCG (Basal)	CMS (40 jours)	CMS+BCG (18ème jour)
-------------------------------------	---------------------------	---------------------------------

2. Test de mesure de la dépression

Croix surélevée	Nage forcées	Anhédonie	Poids corporel
------------------------	---------------------	------------------	-----------------------

3. Sacrifice des animaux

Récupération du sang (Dosage hormonal de la testostérone par ELISA)	Récupération des organes (Poids relatifs du cerveaux, testicule et surrénale)
--	--

Figure III.1 : Protocole expérimental

III.2.7. Etude comportementale

III.2.7.1. Test du en croix labyrinthe surélevé

Cf. Chapitre II.2.7.1

III.2.7.2. Test de la nage forcée

Cf. Chapitre II.2.7.2

III.2.8. Collecte des organes et des échantillons sanguins

Les prélèvements sanguins se font par voie rétro-orbitaire à l'aide d'un tube capillaire le matin entre 08h et 10h. Le sang est recueilli dans les tubes héparinés puis centrifugés à 5000 tours /minute. Le sérum est aliquoté en trois fractions dans des tubes Eppendorf puis mis au congélateur jusqu'au moment du dosage hormonal de la testostérone plasmatique.

Au terme de l'expérimentation, les rats ont été sacrifiés sous une légère anesthésie à l'éther. Les testicules, les surrénales et le cerveau 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.

III.2.9. Dosage de la testostérone par la méthode ELISA

Cf. Chapitre II.2.9

III.2.10. Analyse statistique des résultats

Le Graph Pad Prism 5 pour Windows version 5.01 a été utilisé pour faire l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les résultats ont soumis à une analyse de la variance ANOVA1 ou ANOVA2 suivie par le test *post hoc* de Newman et Keuls ou Benferroni. Les résultats ont été considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

III.3. RÉSULTATS

III.3.1. Effet du CMS et CMS +BCG sur le comportement dépressif-like (Nage forcée)

L'analyse de variance ANOVA1 a été réalisée afin de comparer les moyennes des différents groupes Contrôle, CMS et CMS+BCG et BCG au cours de la nage forcée (immobilité, escalade et nage). Ce test est suivi de Benferroni *post hoc* test dans le cas où l'ANOVA nous signale une différence significative entre les moyennes des différents groupes.

Le CMS a induit un comportement dépressif-like attesté par une augmentation significative du temps d'immobilité dans la FST (R au carré = 0.8021, $F = 37.84$; $p < 0,0001$). Le traitement des rats stressés par le BCG produit un effet antidépresseur-like expliqué par la réduction des temps d'immobilité (contrôle vs CMS+BCG: $t=6.699$, $p < 0,0001$); Par contre on remarque un comportement dépressif-like attesté par une augmentation significative du temps d'immobilité induit par le BCG (BCG vs CMS+BCG: $t=8.380$; $p < 0,0001$); (Contrôle vs BCG: $t = 1,681$).

Nous avons également constaté un effet significatif du CMS sur le temps d'escalade (R au carré = 0.8977, $F = 81,93$; $p < 0,0001$). Benferroni test indique que la CMS provoque une diminution significative du temps d'escalade chez les animaux stressés par rapport au groupe contrôle (contrôle vs CMS: $t = 5.421$; $p < 0,0001$). Le temps d'escalade augmente chez le groupe CMS + BCG par rapport au contrôle et CMS groupes (contrôle vs CMS + BCG: $t = 9.629$; $p < 0,0001$); (contrôle vs BCG: $t = 4.989$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + BCG: $t = 9,810$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS + BCG: $t = 15,05$; $p < 0,0001$). Le traitement de animaux a aussi un effet sur le temps de nage (R au carré = 0,8950; $F = 79,56$; $p < 0,0001$). Benferroni test indique que la CMS +BCG induit une augmentation significative du temps de nage comparativement aux animaux stressés (CMS vs CMS+BCG: $t=10.02$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS +BCG: $t=12.98$; $p < 0,0001$). (Contrôle vs CMS+BCG : $t=8.326$, $P < 0.0001$).

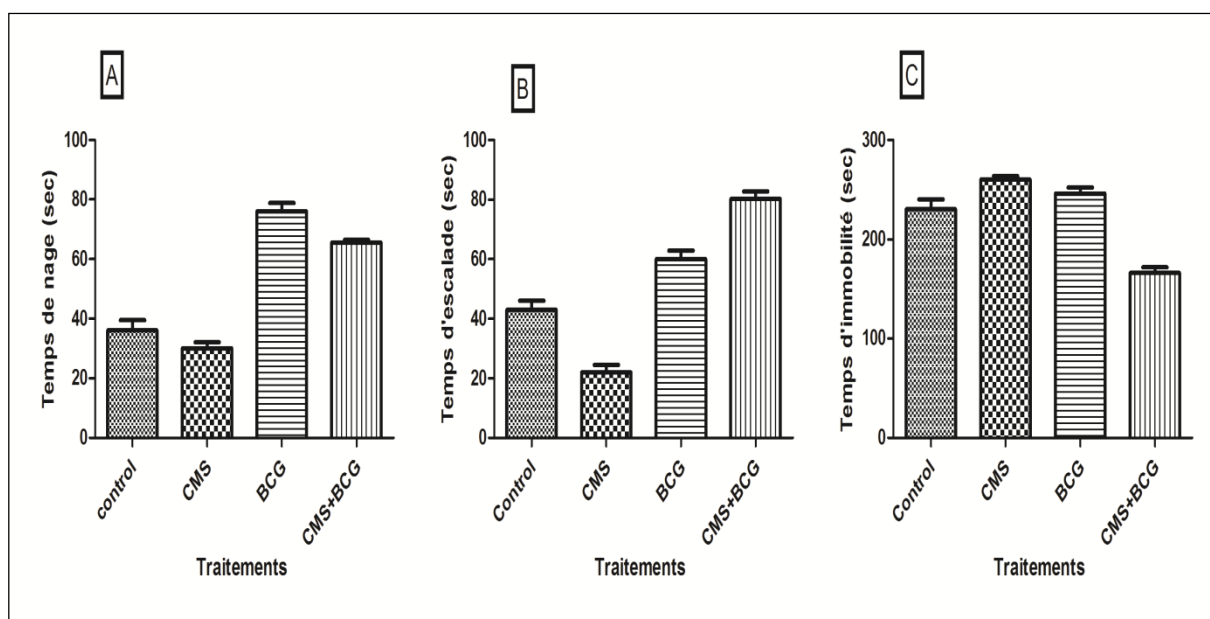


Figure III.2: Effet du CMS et CMS + BCG sur le comportement du type dépressif au test de la nage forcée (A: Temps de nage, B: Temps d'escalad, C: Temps d'immobilité). L'analyse de la variance et le test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les groupes l'un à l'autre (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

III.3. 2. Effets comportementaux de type anxieux du CMS et CMS + BCG dans le test du labyrinthe en croix surélevée

L'analyse de variance ANOVA1 a été utilisée pour étudier les effets comportementaux de type anxieux dans l'*Elevated plus maze* (EPM). L'analyse du temps passé dans les bras ouverts a révélé un effet significatif des traitements ($R^2 = 0,8959$; $F = 80,32$; $p < 0,0001$). Le traitement (CMS et BCG) a également un effet sur le nombre d'entrées dans les bras ouverts ($R^2 = 0,3962$; $F = 136,9$; $p < 0,0001$) et le temps d'immobilité ($R^2 = 0,8327$; $F = 46,47$; $p < 0,0001$).

Nous avons également constaté un effet significatif du CMS et du BCG sur le temps passé dans les bras ouverts. Benferroni test indique que le CMS et le BCG provoque une diminution significative du temps passé dans les bras ouverts chez les animaux stressés seulement (CMS) et traités seulement (BCG) par rapport au groupe contrôle et au groupe (CMS+BCG) qui présente une augmentation du temps passé dans les bras ouverts (CMS vs CMS+BCG: $t = 5,664$; $p < 0,0001$). (CMS vs contrôle: $t = 13,87$; $p < 0,0001$); (BCG vs contrôle: $t = 12,92$); (BCG vs CMS+BCG: $t = 4,712$; $p < 0,0001$); (contrôle vs CMS+BCG: $t = 8,208$; $p < 0,0001$). Benferroni test indique que l'association du CMS et BCG induit une augmentation significative des nombres d'entrées dans les bras ouverts comparativement aux autres groupes d'animaux (control vs CMS+BCG: $t = 9,953$; $p < 0,0001$); (BCG vs CMS+BCG: $t = 17,46$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS+BCG: $t = 17,46$; $p < 0,0001$). Pour le temps d'immobilité Benferroni test indique que l'association du CMS et BCG induit une augmentation significative du temps d'immobilité comparativement aux autres groupes d'animaux (control vs CMS+BCG: $t = 2,327$; $p < 0,0001$); (BCG vs CMS+BCG: $t = 7,950$; $p < 0,0001$); (CMS vs CMS+BCG: $t = 10,38$; $p < 0,0001$).

Cela nous amène à déduire que la combinaison du CMS et du BCG conduit à une diminution de l'anxiété révélée par une augmentation du temps passé et du nombre d'entrées dans les bras ouverts. Le CMS et le BCG induisent une diminution de l'activité locomotrice.

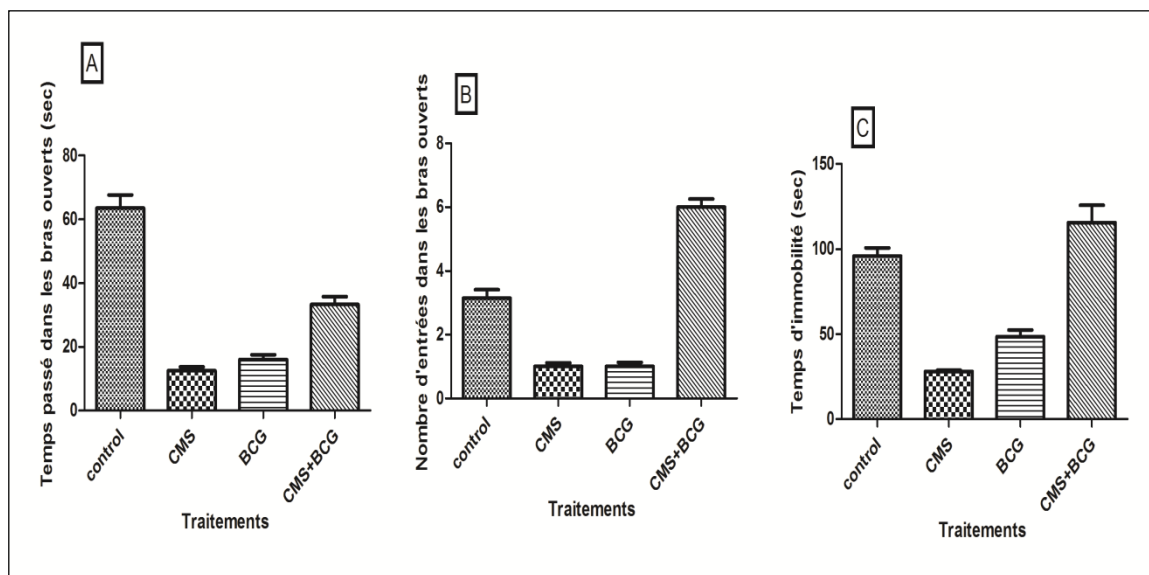


Figure III.3: Effets du CMS et CMS + BCG sur le comportement de type anxiété au test de labyrinthe en croix surélevé (A: Temps passé dans les bras ouverts ("s"), B: Nombre d'entrées dans les bras ouverts, C: Temps d'immobilité ("s")). L'analyse de la variance a été utilisée pour comparer les différents groupes suivi du test de Benferroni de comparaison multiple pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

III.3.3. Évolution temporelle du gain de poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS +BCG:

L'ANOVA à 2 critères de classification indique que le traitement n'a pas d'effet ($F = 6,453; p = 0.0051$), par contre, le facteur jours a un effet ($F = 26,99; p < 0,0001$). Le CMS induit un net effondrement du poids corporel, à la fin de l'expérience (jour 50). Cette diminution est statistiquement non significative.

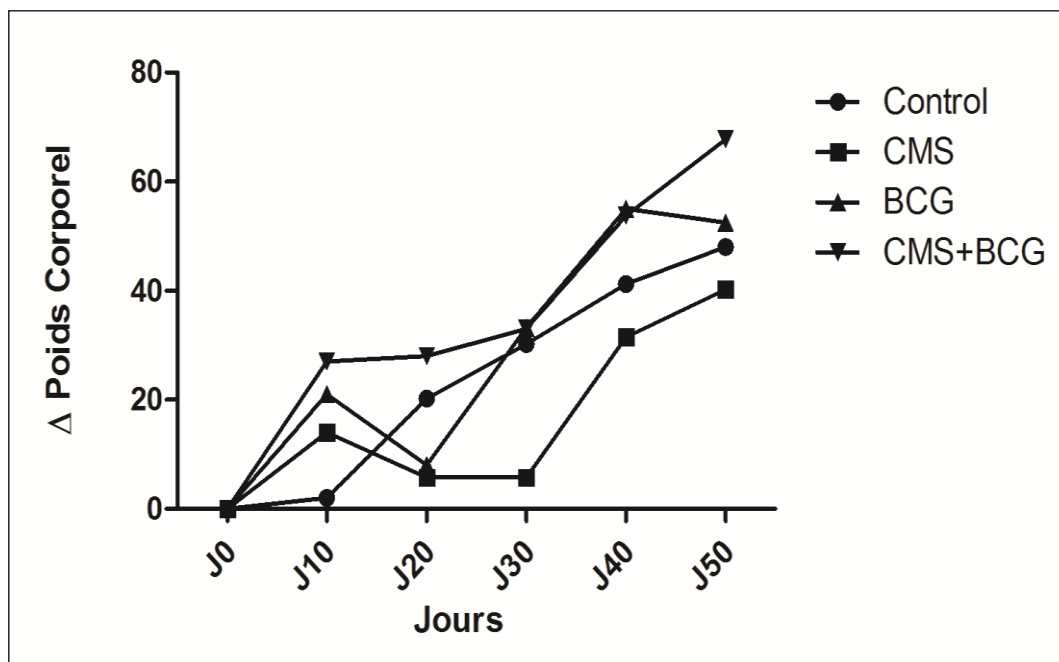


Figure II.4: Évolution temporelle du gain de poids (grammes) mesuré dans le CMS et CMS + BCG. Le traitement par l'ANOVA à 2 facteurs (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer les traitements (* p <0,05 ** p <0,01, *** p <0,001).

III.3.4. Évolution temporelle de la prise alimentaire (g / 100 g de poids corporel) chez les groupes CMS et BCG

L'analyse de variance ANOVA 2 a été réalisée afin de comparer les moyennes des différents groupes Contrôle, CMS et CMS+BCG et BCG au cours de l'expérimentation. Ce test est suivi de Benferroni *post hoc* test dans le cas où l'ANOVA nous signale une différence significative entre les moyennes des différents groupes.

L'ANOVA à 2 critères de classification indique que le facteur interaction, traitement et jour ont un effet significatif sur la prise alimentaire des groupes expérimentaux ($F=897,2$; $F_2=3915$; $F_3=10350$) ($p < 0,0001$).

Le test de Benferroni indique une différence significative sur la prise alimentaire (contrôle vs CMS) aux jours (J03 : $t=32,68$; J08 : $t=55,95$) ($p < 0,001$) (J22 : $t=54,47$; J31 : $t=45,05$) ($p < 0,001$). Contrôle vs BCG, nous remarquons une différence significative aux jours (J03 : $t=24,37$; J08 : $t=39,14$) ($p < 0,001$) (J16 : $t=16,25$; J22 : $t=15,69$; J31 : $t=19,94$) ($p < 0,001$).

À propos du groupe contrôle vs CMS +BCG, on note une différence significative en jours (J03 : $t= 9,232$; J08 : $t=13,85$; J16 : $t=28,25$; J22 : $t=8,494$; J31 : $t=25,67$) ($p < 0,001$). Pour le groupe (CMS vs BCG) on note une différence de signification ($p < 0,001$) entre les jours (J03 : $t=57,05$; J08 : $t=95,09$; J16 : $t=19,48$; J22 : $t=70,16$; J31 : $t= 25,11$). Le groupe (CMS vs CMS+BCG) présente une différence de signification de $p < 0,001$ (J03 : $t= 23,45$; J08 : $t=69,79$; J16 : $t=31,48$; J22 : $t=62,96$; J31 : $t=19,39$) ($p < 0,001$). Enfin, le groupe (BCG vs CMS + BCG), présente une différence significative ($p < 0,001$) tous les jours de traitement (J03 : $t= 33,60$; J08 : $t=25,30$; J16 : $t=12,00$; J22 : $t=7,201$; J31 : $t=5,724$) ($p < 0,001$).

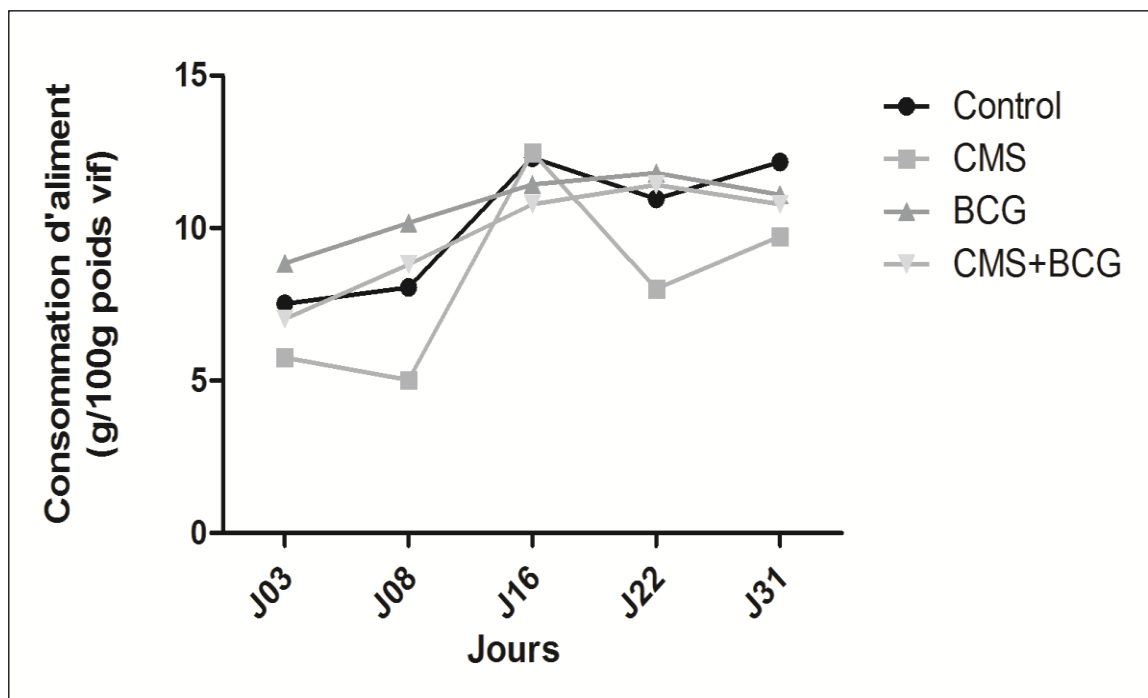


Figure III.5: Effets du CMS et du BCG sur l'apport alimentaire (g / 100 g de poids corporel) mesurées dans CMS et CMS + BCG. Le traitement par l'ANOVA (X jours) et le post-test de Benferroni ont été utilisés pour comparer chaque colonne (traitements) à toutes les autres colonnes (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001).

III.3.5. Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans le CMS et CMS+ BCG

L'ANOVA à deux voies a indiqué un effet significatif du traitement ($F = 256,2$; $p < 0,0001$), jours ($F = 107,4$; $p < 0,0001$) et une interaction ($F = 57,73$; $p < 0,0001$). Les post-tests Benferroni été utilisés pour comparer chaque colonne (traitements) à toutes les autres colonnes. Le test a révélé une différence significative entre le contrôle vs (CMS, CMS + BCG et BCG) le jour 34 et le jour 39. Aucune significative observée entre le contrôle et la CMS + BCG au jour 00, jour 11, jour 21 et jour 34.

Table III.2. Test de comparaison multiple de Bonferroni. Apport de saccharose (%) dans les groupes CMS et BCG (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Jours	00	11	21	34	39
Control vs CMS (t, p)	2.797 *	1.050 Ns	20.81 ***	10.29 ***	21.68 ***
Control vs BCG (t, p)	2.735 *	0.8814 Ns	0.3805 Ns	7.210 ***	14.50 ***
Control vs CMS+ BCG (t, p)	0.00 Ns	0.00 Ns	0.00 Ns	1.694 Ns	3.695 **
CMS vs BCG (t, p)	0.06179 Ns	0.1691 Ns	21.19 ***	3.077 *	7.119 ***
CMS vs CMS+ BCG (t, p)	2.797 *	0.1.050 Ns	20.81 ***	11.98 ***	17.93 ***
BCG vs CMS+BCG (t, p)	2.735 *	0.8814 Ns	0.3805 Ns	8.905 ***	10.81 ***

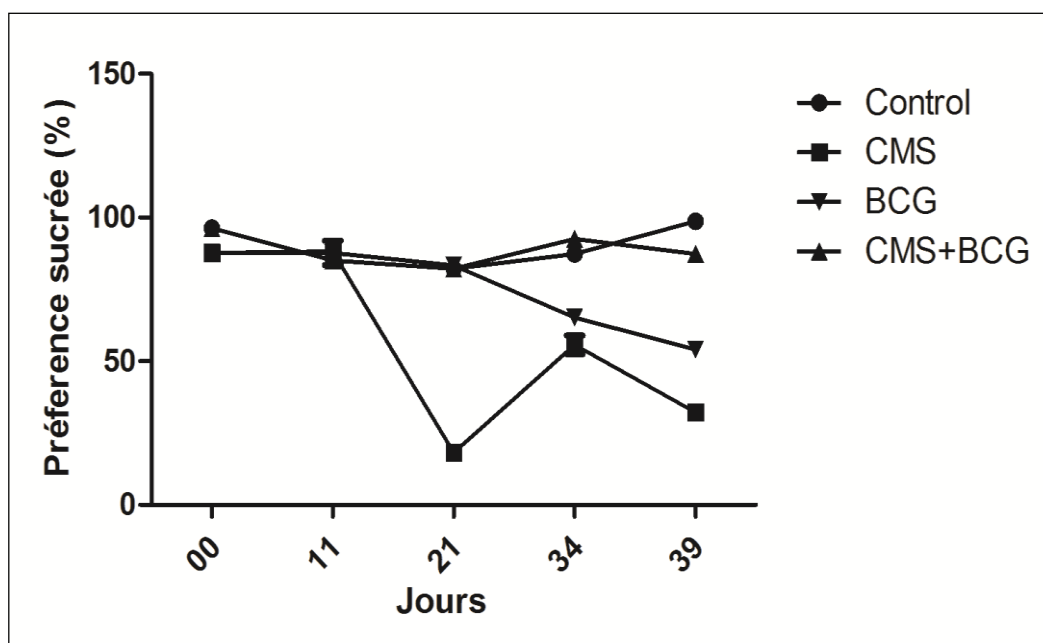


Figure III.6: Évolution temporelle de la consommation de saccharose (%) dans les groupes CMS et BCG. Deux voies de traitement ANOVA X jours et post-test de Benferroni ont été utilisés pour la comparaison (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

III.3.6. Variation des niveaux de testostérone (ng/ml) chez les animaux soumis au CMS et traités au BCG.

Le CMS a diminué de manière significative les niveaux relatifs de testostérone ($F = 24,43$; R au carré = $0,7236$; CMS vs contrôle: $q = 11,18$; $p < 0,0001$). Cette diminution est inversé par un traitement au BCG (CMS + BCG vs contrôle: $q = 3,825$; $p < 0,01$ BCG vs CMS+BCG $q=4,591$ $p < 0,001$).

III.3.7. Variation du poids relatif des organes (cerveau, testicule et surrénales) (g) chez les animaux soumis au CMS et traités au BCG.

Le post-test de comparaison multiple de Newman-Keuls n'a révélé aucune différence significative du poids du cerveau entre les groupe expérimentaux ($p < 0,05$).

Une différence significative a été observée concernant le poids des glandes surrénales chez les groupes contrôle vs CMS+BCG : $q=4.375$ ($p < 0,05$) ; contrôle vs CMS : $q=3.889$ ($p < 0,05$) ; contrôle vs BCG : $q=2.917$ ($p < 0,05$). Mais aucune signification n'est trouvée chez les autres groupes.

Enfin, le poids des testicules présente une différence non significative entre les groupes expérimentaux : (Contrôle vs CMS) , ($p < 0,05$), (contrôle vs CMS + BCG, contrôle vs BCG), (CMS + BCG vs CMS) , (CMS + BCG vs Controle, CMS vs BCG).

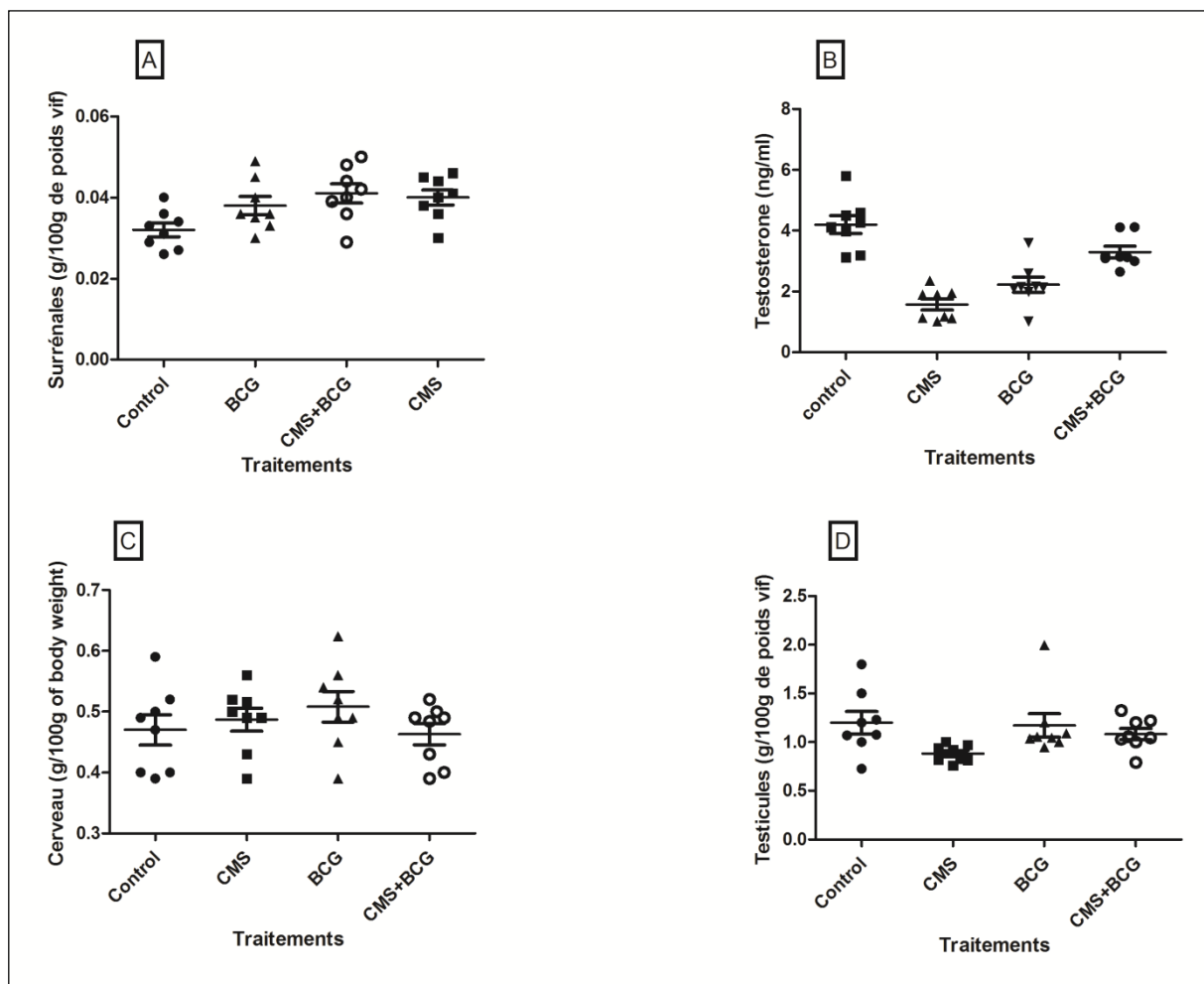


Figure III.7: Variation du poids relatif des organes (g / 100g de poids corporel) (A: Surrénales, C: Cerveau, D: Testicules) et du niveau de testostérone (ng / ml) (B) chez les animaux soumis au CMS et CMS+BCG. L'analyse de la variance et le test post hoc test de multiple comparaison de Newman-Keuls ont été utilisés (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

III.4. DISCUSSION

De nombreuses études ont été entreprises pour comprendre le rôle des différents facteurs contribuant au développement de la dépression et l'anxiété (McEwen, 2005). Le modèle expérimental le plus utilisé généralement pour évaluer les effets de la dépression chez les rongeurs est le CMS (Stress chronique imprédictible) à l'origine développé par Willner (Zunszain *et al.*, 2011 ; Dagyte *et al.*, 2011). Les rats exposés au CMS pendant 40 jours ont montré une dépression caractérisée par le développement des comportements symptomatiques de la dépression des humains, tels qu'une réduction significative de la locomotion (Zunszain *et al.*, 2011), l'anhédonie, un symptôme important de dépression, et la perte de poids corporel (You *et al.*, 2011). L'exposition à un stress chronique peut également produire des troubles psychologiques graves tels que l'anxiété et diminution des capacités mémoratives liée à la dépression (Wollman, 2010). Nos résultats ont prouvé que le CMS a induit les changements comportementaux cités ci-dessus. Dans le test du labyrinthe en croix surélevée, les rats ont peur des hauteurs et prennent naturellement refuge dans les bras fermés du dispositif qui fournissent une plus grande sécurité. Les animaux moins anxieux circulent plus librement dans les bras ouverts du dispositif (Elizalde *et al.*, 2008). Le test EPM a montré une augmentation des niveaux d'anxiété chez les rats soumises à une contrainte (CMS) exprimées par une diminution du nombre d'entrées et du temps passé dans les bras ouverts (Figure III.3). L'augmentation du temps d'immobilité des souris soumises au CMS indiquent une diminution d'activité locomotrice. Concernant l'évolution du poids corporel (Figure III.4), nous avons constaté que les rats CMS montrent une perturbation du poids après que seulement 10 jours de CMS et de la courbe du poids demeure en deçà durant toute l'expérience. Ceci indique que le modèle animal de dépression a été mené avec succès.

Le CMS induit non seulement des comportements dépressive-like mais également des déficits neurocognitives. Par conséquent, il est important d'examiner les associations entre la diminution de la neurogenèse et le fonctionnement neurocognitive après CMS. Ainsi, le CMS augmente IL-1 β , TNF α et IL-6 et provoque des défauts neurocognitive mesurés au test de morris et au test de reconnaissance des objets (Li *et al.*, 2008). Dans une autre étude, le CMS a réduit de manière significative la survie de nouvelles cellules du cerveau dans le hippocampe (Mineur *et al.*, 2007). Une relation de cause à effet a été retrouvée entre l'altération de l'hippocampe, la diminution de la neurogenèse et les comportements (Mineur *et al.*, 2007). Dans le labyrinthe de Morris, il a été constaté que le CMS peut également induire une altération de la mémoire, à travers la mesure de divers paramètres, c.-à-d. le

nombre d'entrées dans le quadrant cible, le temps passé dans le quadrant cible, temps de latence, la distance parcourue et le temps de conservation (**Frih et al., 2012**). En examinant le 4ème jour sans plate-forme, où les mouvements des souris ont été surveillés pendant 60 secondes afin d'évaluer leur stratégie de recherche de plate-forme et leur capacité de rappeler son emplacement, nous avons enregistré dans le groupe de CMS une activité locomotrice réduite (nombre d'entrées et de temps passés dans le quadrant cible) (**Frih et al., 2012**), qui explique l'état de déficit des processus neuronaux dans l'intégration sensorielle qui reflète un dysfonctionnement dans la mémoire spatiale (**Wollman, 2010**). L'index de rétention a été sensiblement diminué. Au contraire, la distance parcourue a été augmenté. De nos résultats et études précédentes sur le CMS, nous pouvons confirmer que le CMS cause une dépression caractérisée par une anxiété accrue associée à une diminution de la locomotion (**Gomes et al., 2009**) et à une dégradation de la mémoire (**Wollman, 2010**).

Parmi les hypothèses proposées pour expliquer la dégradation inhérente au CMS, il y a le neurotoxicité de quelques produits de stress, comme production des neurotoxines des médiateurs de l'inflammation, des cytokines pro inflammatoires, des radicaux libres par des monocytes et des astrocytes, de l'activation des récepteurs neuronaux glutamatergic NMDA, de l'apoptosis neuronale, changement de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) en circulant des cytokines et le choc oxydant responsables du dysfonctionnement neuronal suggéré comme convergence possible de ces facteurs à un chemin commun (**Mollace et al., 2001 ; Power et al., 2002 ; Pomerantz, 2004 ; Wallace, 2006**).

Le processus inflammatoire peut contribuer aux dommages du BHE. En effet, l'activation du microglie peut sortir plusieurs substances toxiques comprenant RNOS, cytokines et glutamate, contribuant aux dommages endothéliaux. En outre, les cytokines tels qu'IL-1 β et TNF- α stimulent l'expression des molécules d'adhérence cellulaire telles qu'ICAM-1, menant aux extravasations des leucocytes dans le cerveau, produisant également des substances toxiques semblables à ceux du microglia activé.

L'état d'inflammation lié à la dépression n'est pas limité aux changements du BHE, il est également trouvé dans le cerveau où l'expression des cytokines est différente comparée aux tissus périphériques (**You et al., 2011**). Le stress induit des réponses inflammatoires dans diverses régions de cerveau produisant des cytokines pro-inflammatoires tels que TNF- α , IL-6 et IL-1 (**Zunszain et al., 2011 ; Bian et al., 2012**). Cette production est associée à une diminution de BDNF (facteur neurotrophic cerveau-dérivé) et de neurogénèse (**Miller, 2010**). Les cytokines sont constitutivement exprimés dans le système nerveux central (CNS),

agissant en tant que les modulateurs des fonctions neuronales et de la survie neuronale, et dans le cas de le stress chronique, ils deviennent néfastes (**You et al., 2011**). Beaucoup d'étude ont prouvé que le stress accélère l'apoptose des neurones et entraîne des changements dans la structure et la fonction de l'hippocampe chez les rongeurs. Le hippocampe est la cible commune de beaucoup d'antidépresseur (**Zunszain et al., 2011**). Le CMS réduit la neurogenèse hippocampal adulte (**Dagyte et al., 2011**) et le stress oxydant cause in vivo une détérioration de l'hippocampe, induisant le comportement d'anxiété et une diminution d'activité locomotrice chez les souris (**Skurlova et al., 2011**).

Généralement le CMS peut produire des troubles psychologiques graves (anxiété, dépression, etc...) et des désordres importants la mémoire qui ont été assignés aux divers facteurs neurobiologique (**Wollman, 2010**). Pour quelques auteurs, le stress chronique entraîne en particulier un dysfonctionnement du cortex préfrontal. D'autres auteurs ont mentionné particulièrement l'importance de l'affaiblissement fonctionnel du hippocampe pour expliquer des problèmes de mémoire résultant du stress. En outre, l'inflammation peut stimuler l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) par l'intermédiaire de l'action directe des cytokines sur le cerveau et de l'induction de la résistance aux glucocorticoids (**Zunszain et al., 2011**). L'hyperactivation de HPA lié à l'altération du feed-back est le plus largement observé chez les patients déprimés. Les glucocorticoides tel que le cortisol sont les hormones libérées en réponse au stress et régulent le métabolisme et l'immunité mais également la survie et le neurogenese neuronaux. Les études expérimentales et cliniques ont prouvé que les cytokines proinflammatoires causent l'hyperactivation de HPA, interruption du sommeil et l'appétit, activité sexuelle affaiblie, altèrent la mémoire et perturbent la neurotransmission, induisant la dépression et l'anxiété (**Song, 2002**). L'anorexie est également observée après injection de CRF dans noyau paraventriculaire (PVN) et le traitement des animaux avec les antagonistes de CRF (CRF α -hélicoïdal) ou anti-CRF, des blocs les effets de le stress et anorexie ont été induit par la sérotonine (5-HT), suggérant que l'activation de 5-HT mène à la sécrétion de CRF, qui empêche consécutivement l'ingestion de nourriture (**Diane, 2006**).

Les études chez les patients déprimés ont montré l'affaiblissement des immuno-réactions acquises, particulièrement réponses à cellule T. Quelques données suggèrent que les cellules de T activées puissent avoir un rôle neuroprotecteur important dans le cadre du stress et de l'inflammation (**Miller, 2010**). Ces données justifient clairement notre approche dans laquelle nous avons choisi une stimulation antigénique liée au CMS. Il est bien connu que l'inoculation sous-cutanée de BCG contenant l'antigène de la mycobactérie ait induit l'inflammation chez

les rongeurs. Cette inflammation cause la sensibilisation périphérique et centrale (**Parent et al., 2012**). L'inflammation induite par BCG est considérée comme modèle de les maladies auto-immune de cellules T (**Garcia-Bonacho et al., 2000**) et les symptômes centraux constituent le comportement de maladie, ou les changements comportementaux qui accompagnent l'immuno-réaction (**Garcia-Bonacho et al., 2000**). Très récemment, **Parent et al. (2012)** ont montré que le CFA cause la douleur inflammatoire chronique chez les rats et a confirmé que ce modèle est très semblable au CMS concernant l'induction des symptômes de la dépression et de l'anxiété. Dans cette étude, l'injection du CFA chez les souris soumises à un CMS a fourni une réparation partielle de la mémoire dans le labyrinthe de l'eau de Morris exprimé par un certain nombre d'entrées en plus significatif de quart de cercle de cible comparé au groupe de CMS (le schéma 2). Le temps dans le quart de cercle de cible est également supérieur. Le temps de latence et la course sont moins importants. Les résultats d'autres essais comportementaux (champ ouvert et élevé plus le labyrinthe) sont réparation partielle comparable et également montrée dans groupe de CMS + CFA. Concernant l'évolution du poids corporel (le schéma 1) des souris de CFA + de CMS montrent une restauration très significative de poids. Cette variation de poids corporel est associée à un effondrement remarquable du poids relatif du thymus et des surrénales (Tableau 2).

Les études indiquent que l'administration des glucocorticoids a in vivo comme conséquence une involution thymique prononcée chez les souris, tandis que l'adrénalectomie mène à un gain de poids significatif du thymus et de la rate et à une augmentation du nombre de cellules de T spléniques (**Ishiyama et al., 1998**) En échange, le thymus peut également affecter la fonction surrénale. **Hirokawa et al. (1982)** ont constaté que l'implantation du thymus nouveau-né a augmenté le poids des surrénales chez les souris nude. Selon **Arzt et al. (1993)** et **Karanth et al. (1993)**, les cytokines peuvent avoir un effet indirect en induisant la sécrétion du corticotropin hypothalamique sortant l'hormone (CRH), qui joue un rôle trophique important dans l'activité adrénale. Ils ont prouvé que les interleukins IL-2 et IL-6 induisent la prolifération in vitro des cellules de l'anté hypophyse, aussi bien que la sécrétion de l'hormone de croissance (GH), de la prolactine (PRL) et de l'hormone adrénocorticotrope (ACTH). La réduction de fonction thymique peut augmenter la synthèse d'IL-1 (**Song, 2002**). En outre, IL-1 induit un changement dans certains systèmes de neurotransmetteurs semblables à ceux observés chez les rats thymectomisés (**Song, 2002**).

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'effet curatif du BCG obtenu en notre étude. On lui a suggéré qu'un déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et

anti-inflammatoires provoqués par le CMS puisse mener aux changements durables de l'anatomie et de la fonction du cerveau, et ainsi affaiblissement à long terme de l'humeur, de la connaissance et du comportement (**You et al., 2011**). Et il est possible que le BCG administré aux souris de CMS renverserait le déséquilibre entre les cytokines pro-inflammatoires et anti-inflammatoires et cette régénération neuronale d'affect d'effet. On lui a également montré que l'activation du microglia est un phénomène tôt, précédant la rupture de BHE (**Todd Butterworth, 1999**). Cependant, l'activation du microglia par BCG, bien que souvent lié à la cytotoxicité a pu probablement protéger le BHE contre l'effort. D'ailleurs TNF α peut par l'intermédiaire du TNF-récepteur 1(TNF-R1) activent MAPK (protéines kinases activées par mitogène) et augmentent NF κ B (κ B nucléaire de facteur) causant l'apoptose neuronal (**Hallenbeck, 2002**), tandis que l'activation du TNF-R2a probablement comme conséquence les effets neuroprotective (**Williams et al., 2005**). Ainsi, les deux récepteurs de TNF peuvent montrer des fonctions antagoniques sur des processus neurodegenerative par lequel TNF-R1 aggrave et TNF-R2 réduise la perte neuronale de cellules, respectivement (**Hallenbeck, 2002; Williams et al., 2005**). TNF-R1 et TNF-R2 peuvent induire la voie de NF κ B, que ce soit avec la cinétique perceptible et les composants de déclenchement ascendants. Par exemple, TNF-R1 induit une activation passagère de NF κ B, tandis que TNFR2 facilite l'activation kinase-dépendante de NF κ B du phosphatidyl-inositol 3 à long terme (**Marchetti, 2004**). **Munhoz et al.(2004)** a signalé que TNF α joue une fonction clé sur la persistance des dommages cellulaires de cerveau pendant deux semaines après effort répété. Le rôle d'IL-6 en réponse aux facteurs de force externes est très complexe. IL-6 peut protéger des neurones mais en d'autres conditions peut avoir des effets néfastes. Par exemple, l'administration intracérébrale d'IL-6 avant l'exposition des rongeurs aux insultes ischémiques ou excitotoxique empêche la mort de neurone (**Lucas et al., 2006**). Les souris avec IL-6 l'over expression chronique, exposition ont marqué le neurodegeneration et la détresse psychologique qui sont rapportée sa augmenté les concentrations du plasma IL-6 et/ou du cerveau (**Allan et Rothwell, 2003**).

Chapitre IV-
Étude comparative des effets du traitement au BCG
chez des rats mâles et femelles Wistar ayant subi la
ligature du nerf sciatique

Chapitre IV- Étude comparative des effets du traitement au BCG chez des rats mâles et femelles Wistar ayant subi la ligature du nerf sciatique

RESUME

L'objectif de notre travail est l'étude des conséquences de la ligature du nerf sciatique sur l'état de la dépression chez le rat Wistar.

Une ligature du nerf sciatique est réalisée par voie chirurgicale chez deux groupes composés de 08 rats mâles et de 08 rates. Le même nombre chez les mâles et chez les femelles est considéré comme contrôle. Les investigations concernant le degré de dépression sont obtenues grâce au test de la nage forcée de Porsolt (FST). Le degré de dépression est estimé à partir de la mesure du temps d'immobilité au cours du test. En même temps, une étude comparative entre les deux sexes est menée en prenant comme critère de comparaison le niveau de la dépression.

Une augmentation significative du niveau de la dépression est obtenue chez les rats mâles ayant subi la ligature du nerf sciatique. S'agissant de la comparaison entre les rats mâles et femelles, un certain niveau de dépression est enregistré chez les rates et en l'absence de tout traitement. Alors que chez leurs homologues femelles les niveaux de dépression sont très réduits. Ceci a été expliqué par les différences hormonales entre les deux sexes.

La ligature du nerf sciatique provoque la dépression chez le rat. Le FST nous a permis également de constater des différences importantes entre les rats mâles et femelles devant la dépression.

Mots clés : Dépression , Nerf sciatique, Nage forcée, Stéroïde.

الملخص:

الهدف: دراسة الآثار المترتبة على ربط العصب الوركي على حالة من الاكتئاب في الفئران ويستار. الطريقة: يتم إجراء عملية ربط العصب الوركي جراحيا في مجموعتين تتألف من 08 ذكور الفئران و08 إناث الفئران. ويعتبر العدد نفسه في كل من الذكور والإناث كمجموعة تحكم. ويتم الحصول على التحقيقات بشأن درجة الاكتئاب من خلال القسري Porsolt اختبار السباحة (FST). وتقدر درجة الفراغ من قياس الوقت الجمود أثناء الاختبار. وفي الوقت نفسه، أجرت دراسة مقارنة بين الجنسين أخذ كمعيار للمقارنة مستوى الاكتئاب.

النتائج: زيادة كبيرة في مستوى الاكتئاب يتم الحصول عليها في ذكور الجرذان بعد أن خضع لعملية ربط العصب الوركي. وفيما يتعلق بالمقارنة بين الذكور والإناث الفئران، يتم تسجيل مستوى معين من الاكتئاب في إناث الفئران وفي غياب أي علاج. في حين نظرائهم من الإناث مستويات فراغ منخفضة جدا. وأوضح ذلك من خلال الاختلافات الهرمونية بين الجنسين.

الخلاصة: إن ربط العصب الوركي يسبب الاكتئاب لدى الفئران. وفي FST أيضا وجدنا اختلافات كبيرة بين ذكور وإناث الفئران للاكتئاب.

الكلمات الرئيسية: الاكتئاب، العصب الوركي، السباحة القسري، الستيرويد.

ABSTRACT

Study of gender differences in the prevalence of depression (Porsolt swimming test) in sciatic nerve injury model Wistar rats.

A sciatic nerve ligation is performed surgically in two groups of 08 male rats and 08 female rats. The same number in males and females is considered as a control. The investigations concerning the degree of depression are obtained through the Forced Swimming Test Porsolt (FST), Plus maze test and sucrose intake. At the same time, a comparative study between the two sexes.

A significant increase in the level of depression is obtained resulting in male rats that had undergone ligation of the sciatic nerve. Regarding the comparison between males and females rats, some level of depression is recorded in female, while among their female depression levels are very low. This was explained by hormonal differences between the sexes.

The sciatic nerve ligation causes depression in the rat. In the FST also we found significant differences between male and female rats to depression, suggesting the key role of sex steroids.

Keywords: Depression - Sciatic nerve injury - Neuroactive forced swimming test - Gender differences steroids.

IV.1. INTRODUCTION

La douleur est définie selon l'IASP (*International Association for the Study of Pain*) comme une « sensation ou une perception émotionnelle désagréable, consécutive à une altération tissulaire réelle ou potentielle ou décrite en des termes évoquant une telle altération ». La douleur inflammatoire est provoquée par l'activation du système immunitaire lors de blessures et/ou d'infections des tissus. Cette douleur inflammatoire a pour but la protection de l'intégrité physique. En renforçant la sensibilité sensorielle après une lésion tissulaire, elle favorise la récupération de la partie du corps atteinte en créant un environnement d'hypersensibilité désagréable qui décourage le contact physique et le mouvement, réduisant ainsi les risques de dommages supplémentaires (**Woolf, 2010**). Sur le site de la lésion les mastocytes, neutrophiles, macrophages, lymphocytes T et cellules de Schwann interagissent et concourent à la sensibilisation des nocicepteurs (**Marchand et al., 2005 ; Moalem et Tracey, 2006**). Les mastocytes libèrent leurs produits riches en histamine, cytokines et protéases qui vont participer à la sensibilisation des nocicepteurs et attirer d'autres cellules sur le site de la lésion. Ainsi, les mastocytes semblent jouer un rôle important dans l'initiation de la douleur neuropathique (**Zuo et al., 2003**). Les neutrophiles vont sécréter des cytokines (dont le TNF α) (**Leung et Cahill, 2010**), des réactifs oxygénés et des chémokines. La déplétion en neutrophiles circulants est capable de prévenir mais pas de traiter la douleur neuropathique (**Zuo et al., 2003**). En même temps ou après le recrutement des macrophages, les lymphocytes T s'infiltrèrent dans les nerfs lésés (**Marchand et al., 2005**). Ils sont capables d'augmenter leur hypersensibilité douloureuse (**Sommer et Kress, 2004; Moalem et Tracey, 2006**). Les cellules immunitaires résidentes de la moelle épinière et les cellules gliales jouent un rôle majeur dans le développement de la douleur après lésion de nerf périphérique. Les oligodendrocytes sont en étroite relation avec les neurones, les astrocytes, la microglie et les cellules endothéliales. Elles peuvent ainsi répondre et sécréter différentes molécules. Ces cellules sont également sensibles à l'inflammation et à l'élévation du taux de glutamate, observés, par exemple, lors de la lésion d'un nerf périphérique. Selon (**Echeverry et al., 2008**), en cas d'une lésion d'un nerf périphérique, la microglie subit des changements qui aboutissent à un état « activé ». Ces cellules gliales sont capables, sous différentes conditions de stimuler, de produire et de libérer une grande variété de molécules effectrices intercellulaires appartenant à différentes catégories moléculaires, notamment des molécules pro-inflammatoires cytokines, chémokines et facteurs de croissance (**Eddleston et Mucke, 1993; Yeh et al., 2009**). Après la lésion de nerf périphérique, l'activation astrocytaire se

traduit par la libération de différentes molécules, par exemple du glutamate dont la concentration extracellulaire est augmentée. En effet, la recapture du glutamate n'est plus assurée à cause de la diminution de l'expression du transporteur GLT-1 par les astrocytes (**Sung et al., 2003**). De plus, les astrocytes peuvent également moduler leur libération de glutamate (**Araque et al., 1999**). Après lésion de nerf périphérique, on assiste à la libération de différentes molécules proalgésiques par les cellules lésées ou activées. Outre l'histamine, la bradykinine, l'ATP, la sérotonine ou les prostaglandines, les cytokines jouent un rôle aussi bien à la périphérie que dans la moelle épinière en agissant directement ou indirectement sur les neurones sensoriels primaires ou secondaires (**Moalem et Tracey, 2006**).

Les cytokines sont des polypeptides médiateurs de l'immunité et de l'inflammation. Elles participent à des fonctions biologiques très diverses dans plusieurs systèmes, dont le SNC. La présence de cytokines inflammatoires dans le cerveau a été initialement attribuée à une synthèse exclusive par les cellules myélo-monocytaires infiltrantes (puisque les cellules nerveuses n'étaient pas supposées produire et utiliser ces molécules). Des études sur des cellules en culture ont montré une capacité de synthèse du TNF α par les cellules gliales, les astrocytes et surtout par la microglie (**Holsboer, 1999**). Les récepteurs de différentes cytokines sont présents dans le cerveau, soit dans l'hypothalamus même, soit dans des structures cérébrales directement connectées à l'hypothalamus (**Vitkovic et al., 2000**). Certaines d'entre elles sont pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β et IL-6), d'autres exercent une activité anti-inflammatoire comme, par exemple, l'IL-10. L'implication des cytokines dans la douleur a été démontrée pour la première fois en 1988 (**Ferreira et al., 1988**). Mais, comme l'attestent des expériences d'inhibition de leur activité, les cytokines ne participent pas à la douleur aiguë (**Ramer et al., 2001**). Les cytokines pro-inflammatoires sont impliquées dans les phénomènes d'hypersensibilité à la douleur. Elles agissent aussi bien à la périphérie qu'au niveau central. Leur rôle à la périphérie a notamment été étudié sur des préparations peau-nerf (**Oprea et Kress, 2000**). L'expression de ces trois (03) cytokines est également augmentée dans la moelle épinière (**Winkelstein et al., 2001**). Injectées par voie intrathécale, elles augmentent l'activité des neurones de la corne dorsale et induisent chez l'animal une hypersensibilité douloureuse (**Reeve et al., 2000**). Des études cliniques ont d'ailleurs montré qu'il existait un déséquilibre entre cytokines pro- et anti-inflammatoires chez les patients atteints de neuropathie douloureuse. Ce déséquilibre serait un facteur prédisposant pour l'apparition de la douleur chronique dans les cas des neuropathies (**Koch et al., 2007 ; Uceyler et Sommer, 2008**).

L'axe HPA est sensible à l'action complexe des cytokines, qu'elles soient produites dans le SNC ou acheminées par voie sanguine du fait de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique dans la région hypothalamique. L'IL-1, l'IL-6, l'interféron et le TNF α ont une action activatrice sur cet axe. La libération par les surrénales des glucocorticoïdes inhibe la réponse inflammatoire et permet de contenir la réaction immunitaire (**Cartmell et al., 1999**) la libération de CRH, est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-6 et l'IFN α , mais inhibée par la cytokine anti-inflammatoire TGF α . L'activation de l'axe HPA par les cytokines s'accompagne également d'effets sur le métabolisme de certains neuromédiateurs (GABA, 5HT ...) (**Dunn et al., 1999**), aussi les surrénales constituent un autre site d'interaction entre l'axe HPA et les cytokines (**Marx et al., 1998**).

Les interactions entre le Système Nerveux Central (SNC), le stress et le système immunitaire sont mieux connues, en particulier le rôle qu'y jouent les cytokines sur les cellules ainsi que comme acteurs de liaison et de médiation entre les deux systèmes (**Thurin, 1996**). Aussi, le stress oxydatif est associé aux douleurs neuropathiques à la suite d'une lésion d'un nerf périphérique (**Tanabe et al., 2009**). L'activation de la NAD(P)H (nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate)-oxydase est une source intracellulaire importante de radicaux libres conduisant à l'activation d'une variété d'événements de signalisation causant l'expression de cytokines pro-inflammatoires, l'hypertrophie, la transcription de gènes et la migration cellulaire (**Kim et al., 2010**). Dans des cas de douleurs neuropathiques accompagnées d'une lésion d'un nerf périphérique, la NADPH oxydase peut être suractivée (**Ibi et al., 2008 ; Kim et al., 2010**), ce qui occasionne des effets délétères (dommages à l'ADN et aux protéines). L'oxyde nitrique synthase (NOS) est potentiellement impliqué dans l'entretien de la douleur neuropathique (**Tanabe et al., 2009**). De plus, une augmentation significative des niveaux de NO a été mesurée dans le nerf sciatique ligaturé (**Naik et al., 2006**).

Il existe plusieurs modèles animaux de douleur neuropathique, surtout chez le rat, la plupart basés sur la production d'une lésion d'un nerf périphérique (principalement le sciatique) par un trauma physique ou chimique (**McMahon et al., 2005 ; Ueda, 2008**). Ce modèle a vu le jour en 1988 (**Bennett et Xie, 1988**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre travail, qui est conduit sur des rats ayant subi une ligature du nerf sciatique. En se basant sur le test de la nage forcée (FST), nous avons cherché dans un premier temps d'éventuelles relations entre la ligature du nerf sciatique et l'incidence de la dépression, puis dans des investigations complémentaires, l'éventualité d'une différence dans le degré de dépression entre rats mâles et femelles neuropathiques.

IV.2.MATÉRIEL ET MÉTHODES

IV.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique que nous avons utilisé dans notre étude est le rat Wistar provenant de l'Institut Pasteur d'Alger. Les animaux, dont le poids varie entre 200 et 250 grammes, ont été acclimatés aux conditions standards, de température et d'humidité. L'élevage a été conduit dans des cages en polyéthylène, tapissées d'une litière composée de copeaux de bois. Les conditions d'hygiène et de prophylaxie ont été observées.

IV.2.2. Modèle animal :

Notre étude a pour objectif d'étudier, l'incidence de la dépression chez les rats ayant subi la ligature du nerf sciatique, ainsi que la mise en évidence d'éventuelles différences entre les rats mâles et femelles.

À cet effet, nous avons défini quatre (04) lots expérimentaux répartis comme suit :

- Contrôle male (n=08)
- Contrôle femelle (n= 08)
- LIG male (n= 08)
- LIG femelle (n= 08)

IV.2.3. Ligature du nerf sciatique « *sciatic nerve injury* »

Le modèle du rat *Ratus ratus* de la souche *Wistar* a subi la ligature du nerf sciatique tandis que le nerf sural est laissé intact (**Zaafour et al., 2015**). Les résultats des lésions dont l'hypersensibilité est marquée dans la zone latérale de la patte qui est innervée par le nerf sural a été épargnée. Le côté non opéré du rat a été utilisé comme contrôle.

Les rats ont subi des interventions chirurgicales « ligature du nerf sciatique » (*sciatic nerve injury*). Suite à cette opération, les sujets ont bénéficié d'un traitement d'anti-cycline à une dose de 0.3 ml durant cinq (05) jours par une injection intra-péritonéale, après une période d'un repos total de dix (10) jours.

1. Lotissement des rats

Contrôle mâles
(n=08)

ligature mâles
(n=08)

Contrôles femelles
(n=08)

Ligature femelles
(n=08)

2. Ligature du nerf sciatique

Anesthésie

Chirurgie

Période post-chirurgie

Traitement par injection intra-péritonéale de 0.3ml d'Anticycline pendant 5 jours

3. Test de mesure de la dépression

Labyrinthe surélevé

Nage forcée

Préférence sucrée

La batterie de test se fait chaque dix jours

Figure IV.1 : Protocole expérimental.

IV.2.4. Protocole expérimental

IV.2.4.1. Anesthésie

- Rats anesthésiés par une injection intrapéritonéale de Kétamine 0.3ml/100g + une goutte par voie orale de Largactil (chlorpromazine).
- Animaux placés dans un endroit calme et tranquille jusqu'à ce qu'ils soient totalement anesthésiés.
- Vérification des réflexes des rats en pinçant le bout de la queue et des pattes avec une paire de pincette afin de nous assurer de l'immobilité des animaux avant toute intervention chirurgicale.
- Rasage des champs opératoires (à l'aide d'un rasoir électrique) légèrement en dessous de la zone du genou à la région de la hanche.
- Application d'une pommade ophtalmique pour les yeux des animaux à l'aide d'un coton-tige.
- Animal placé sur son côté droit (ou gauche) et placement du membre postérieur gauche (ou droit) sur une petite plate-forme afin de la tenir élevée. Fixation de la jambe avec du ruban adhésif.
- Désinfection du champ opératoire avec une alternance de gommage d'éthanol et de l'extérieur de la Bétadine sur le site chirurgical.

IV.2.4.2. Chirurgie

- Localisation du genou avec le pouce de la main gauche et utilisation d'un scalpel pour faire une application. Une incision de quelques cm dans le sens longitudinal proximal du genou.
- Ouverture la peau par dissection en utilisant la pointe d'une paire de ciseaux stérilisée.
- Séparation de la couche musculaire par dissection juste à côté du vaisseau sanguin clairement visible, près du fémur (os de la cuisse). Les couches musculaires se séparent facilement sans aucun saignement, révélant le nerf sciatique droit ou gauche en dessous du muscle.

Il est à signaler qu'en cas de saignement suite à un dommage d'un vaisseau sanguin près du genou, il faut stériliser à l'aide d'un coton bourgeon corps pour absorber le sang en appuyant sur jusqu'à ce que le saignement s'arrête.

- Rat placé sous un microscope stéréo pour séparer délicatement les muscles avec une paire de pincettes stérilisées afin de visualiser nettement le nerf sciatique.
- Identification de la zone des branches collatérales et saphènes du nerf sciatique sachant que le nerf sural est la plus petite des trois branches.
- Réalisation d'un nœud serré chirurgical autour du nerf sciatique. Si le premier nœud est serré les contractions du membre seront observées.
- Coupure des extrémités de suture avec une paire de micro-ciseaux et fermeture délicate de la couche musculaire. Ajout d'une goutte de la Lidocaïne sur la plaie et suture à l'aide de nœuds chirurgicaux.

IV.2.4.3. Période post-chirurgie

- Vérification de la suffisance de la pommade oculaire.
- Rat placé dans une cage propre sous une serviette de papier dans une posture confortable à une température ambiante.
- L'eau et l'aliment sont facilement accessibles pour l'animal opéré.
- Injection en intra-péritonéal de l'antibiotique à une dose de 0.3ml durant cinq (05) jours après l'intervention chirurgicale.
- Réalisation d'une batterie de tests comportementaux (douleur neuropathique et mesures d'anxiété et de dépression) après dix (10) jours de la chirurgie.

IV.2.5. Méthodes :

IV.2.5.1. Test de labyrinthe surélevé

Cf. Chapitre II.2.7.1

IV.2.5.2. procédure de la nage forcée (*Forced Swimming Test*)

Cf. Chapitre II.2.7.2

IV.2.5.3. Test de préférence sucrée

Cf. Chapitre II.2.3

IV.2.6. L'analyse statistique des résultats

Le Graph Pad Prism 5 pour Windows version 5.01 a été utilisé pour faire l'analyse. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Les données ont été analysées par une analyse de la variance ANOVA1 ou ANOVA2 suivie par le *post hoc* test de Newman et Keuls ou Benferroni. Les résultats ont été considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

IV.3. RESULTATS :

Les histogrammes ci-dessous représentent les résultats du test de la nage forcée où l'analyse de variance a été réalisée par l'ANOVA1 et suivi d'un test de Newman et Keuls, en cas de différence significative entre les différents groupes.

IV.3.1. Variation des paramètres du test de la nage forcée (Forced Swimming test) :

Pour ce qui est du temps d'immobilité (Figure IV.2), nous avons remarqué une différence très hautement significative ($F=21.93$, $R\ square=0.7327$, $p<0.0001$). Le temps d'immobilité des rats ligaturés est significativement plus élevé que celui des rats contrôle (contrôle M vs Lig M). Les rats contrôle ont un temps d'immobilité significativement inférieur à celui des rats contrôle (contrôle M vs contrôle F). Le temps d'immobilité est significativement réduit chez les rats contrôle par rapport aux rats ligaturés (contrôle M vs Lig F). Il est à signaler par ailleurs que le temps d'immobilité est plus élevé chez les rats ligaturés par rapport aux rats ligaturés (Lig M vs Lig F).

Le test de Newman et Keuls a révélé une augmentation significative du temps d'immobilité chez les femelles, comparé aux mâles et ce, avant et après la ligature.

En ce qui concerne le temps de nage (Figure IV.2), l'analyse des résultats a montré des différences significatives entre les animaux mâles et femelles et ce avant et après la ligature. Il est à signaler une augmentation très hautement significative ($F=33.77$; $R\ square= 0.8021$, $P <0.0001$) entre les rats contrôle et les rats ligaturés (contrôle M vs Lig F), entre les animaux mâles ligaturés et les femelles ligaturés (Lig M vs Lig F). Une différence hautement significative est également relevée entre les rats contrôle et les rats contrôle (contrôle M vs contrôle F); et enfin entre mâles contrôle et mâles ligaturés (contrôle M vs Lig M).

Le test de Newman et Keuls indique une augmentation significative du temps de nage chez les mâles par rapport les femelles avant et après la ligature.

L'analyse des résultats concernant le temps d'escalade nous permet de constater une augmentation significative du temps d'escalade (Figure IV.2) chez les femelles par rapport aux mâles. Un niveau significativement plus bas ($F= 11.56$, $R\ square=0.6012$, $p<0.0001$) est signalé chez les rats contrôle par rapport aux rats contrôle (contrôle F vs contrôle M), et contrôle femelles et mâles ligaturés (contrôle F vs Lig M). Le temps d'escalade est significativement plus réduit chez les rats contrôle comparé à celui des rats ligaturés

(contrôle M vs Lig F). Enfin, le temps d'escalade est significativement plus élevé chez les rates ligaturées par rapport aux rats ligaturés (Lig F vs Lig M).

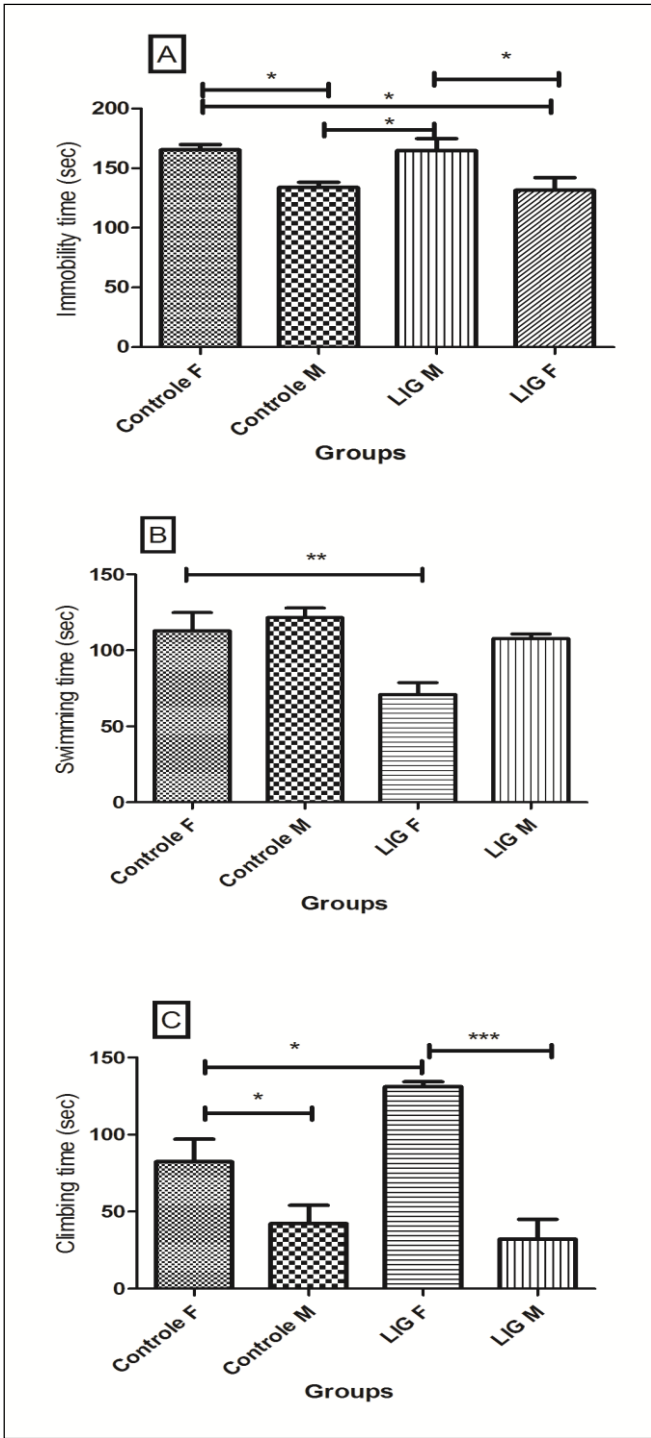


Figure IV.2. Paramètres de la nage forcée chez les rats mâles et femelles ligaturés et non ligaturés. (A: Temps de nage, B: Temps d'immobilité, C: Temps d'escalade).

IV.3.2. Variation des paramètres de plus mase test

L'ANOVA1 pour le temps passé dans les bras fermés révèle un effet significatif de la ligature du nerf sciatique ($F = 320,3$, $R = 0,9717$ Place, $p < 0,0001$).

Le test de Newman-Keuls montre que le niveau d'anxiété est plus élevé chez les rates que chez les mâles témoins. Ceci est révélé par le temps passé dans les bras fermés plus grand chez les rates (commande M vs M commande: $t = 35,40$, $p < 0,05$). Les résultats montrent également que la ligature du nerf sciatique provoque une augmentation du niveau de l'anxiété, comme le montre le temps passé ultérieurement dans les bras fermés chez des rats après ligature du nerf sciatique (contrôle de M vs LIG M: $t = 37,40$, $p < 0,05$).

L'ANOVA1 pour le temps passé dans les bras ouverts a révélé un effet significatif de ligature du nerf sciatique ($F = 353,8$, $R = 0,9743$, $p < 0,0001$).

Le test de Newman-Keuls a signalé un temps passé dans les bras ouverts plus important chez les rats mâles que chez les rates témoins (contrôle F vs contrôle M: $t = 34,81$, $p < 0,05$). De même, il est fait l'état d'une diminution significative du temps passé dans les bras ouverts après la ligature du nerf sciatique (contrôle M vs LIG M: $t = 71,18$, $p < 0,05$).

L'ANOVA1 pour le temps passé dans le centre a révélé un effet significatif de la ligature du nerf sciatique ($F = 6,592$, $R = 0,4139$, $p < 0,0001$).

Le test de Newman-Keuls pour le temps passé dans le centre révèle principalement une augmentation significative du temps passé au centre après la ligature du nerf sciatique (contrôle M vs LIG M: $t = 5,701$, $p < 0,05$).

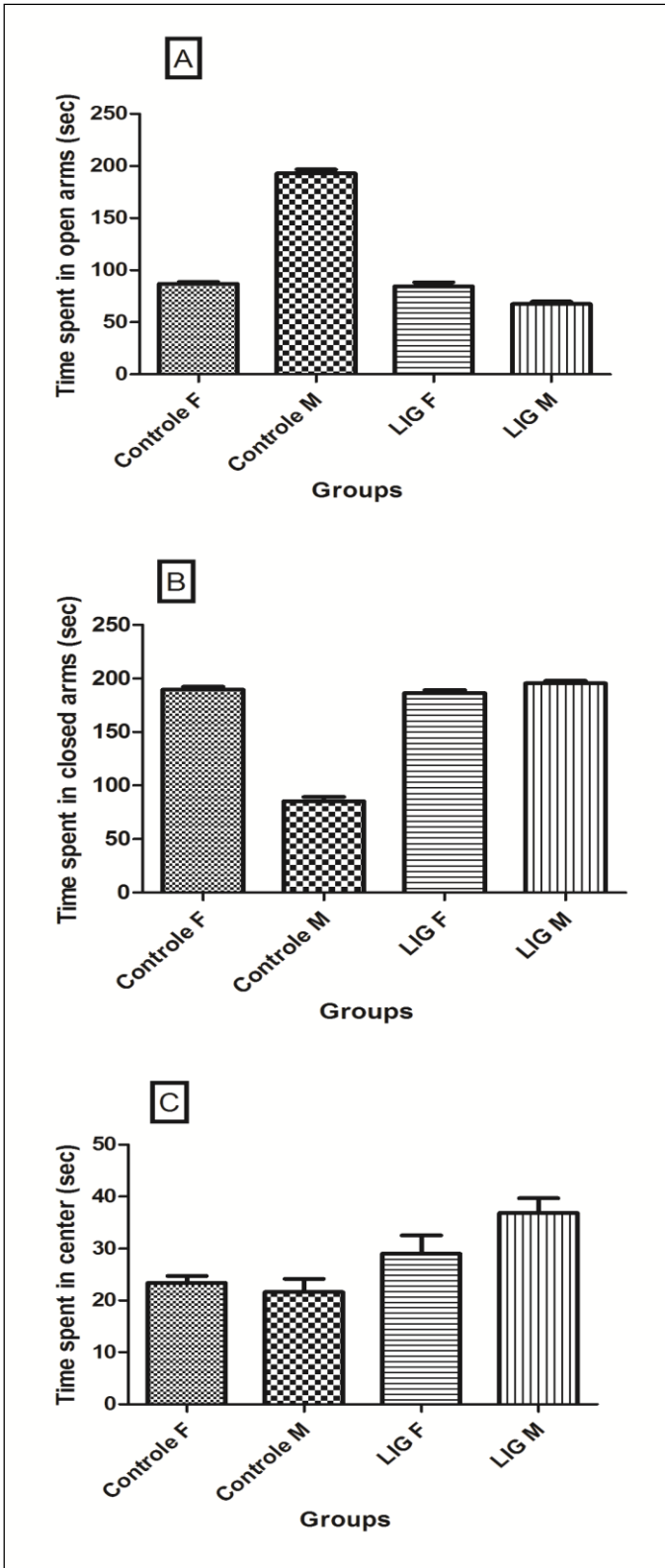


Figure IV.3. Labyrinthe surélevé (EPM). Les paramètres du test chez les rats mâles et femelles ligaturés et non ligaturés (A: Temps passé dans les bras ouverts, B: Temps passé dans les bras fermés, C: Temps passé dans le centre de le dispositif).

IV.3.3. Variation de la préférence au saccharose

L'ANOVA1 a révélé un effet significatif pour la préférence sucrée au cours la ligature du nerf sciatique ($F = 18,36$; $R = 0,6630$ Place, $p < 0,0001$).

Le test de Newman-Keuls de la préférence sucrée montre que le niveau de consommation est significativement plus faible chez les mâles témoins que chez les rates (Contrôle M vs contrôle F: $t = 10,17$; $p < 0,05$). Il semble également que les rats mâles qui ont subi une ligature du nerf sciatique avaient niveaux significativement plus élevés de consommation de sucre (commande M vs LIG M $t = 7,275$, $p < 0,05$).

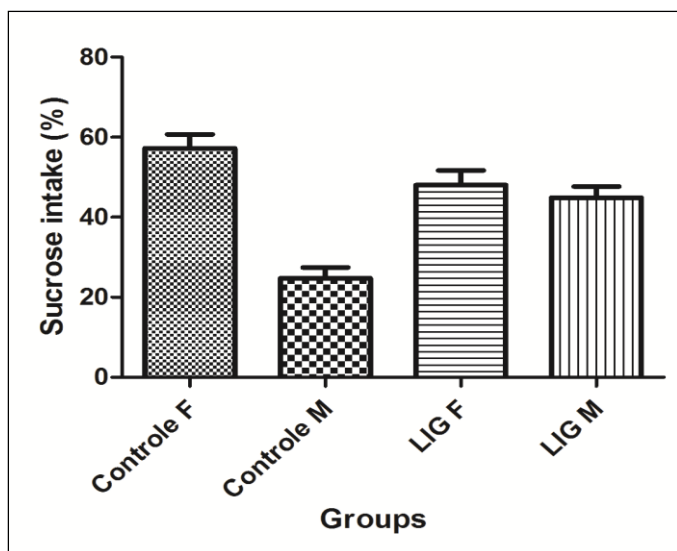


Figure IV.4. Consommation de saccharose chez les rats mâles et les femelles qui ont subi ou non la ligature du nerf sciatique.

IV.4. DISCUSSION

Notre travail consiste à étudier l'effet de la ligature du nerf sciatique sur le degré de dépression des animaux. Il comporte également une étude comparative entre les mâles et femelles. Nos résultats montrent chez les contrôles que le degré de dépression chez les femelles est plus important que chez les mâles, ceci est révélé par les temps d'immobilité qui sont plus importants chez les femelles que chez les mâles. Nous attribuons ces variations du degré de dépression à la fluctuation du niveau des stéroïdes sexuels différents chez les femelles et les mâles. Les différences de sexe existent dans la prévalence des troubles dépressifs. Un certain nombre d'études suggèrent que les rates répondent mieux que les mâles à l'action des inhibiteurs de la recapture de la sérotonine (IRSS) suggérant que les hormones gonadiques modulent l'humeur et la réponse aux médicaments (**Frye et Walf., 2002**).

D'importantes différences liées au sexe ont été régulièrement signalées parce que son incidence sur la prévalence et le risque de morbidité est deux fois plus élevé chez les rates

Les symptômes de la dépression sont également sexuels et les perturbations dans les concentrations circulantes des hormones ovariennes produisent un comportement de la dépression (**Frye et Walf, 2009**). De plus, les changements comportementaux associés avec le cycle œstral, ont clairement montré une réduction de l'immobilité et un comportement actif plus élevé pendant le proestrus (**Contreras et al., 1998**). De ces observations, il semble ressortir que les œstrogènes auraient un effet dépressif (**Verdu et al., 2002**). D'après **Stocco (200)**, cet enzyme pourrait être activé par différents facteurs tels que le stress aigu. Les concentrations d'œstradiol chez les femelles adultes et les rats prépubères pourraient être liées à la réduction de l'immobilité et de son augmentation observée durant l'essai, révélant l'activation du système sérotoninergique (**Estrada-Camarena et al., 2006**).

L'administration de 17 β -œstradiol chez les femelles ou chez les rats mâles fait augmenter la nage et réduit l'immobilité dans la FST. L'œstradiol facilite l'effet des IRSS, comme la fluoxétine, l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A} et bloque l'effet antidépresseur de l'œstradiol dans la FST (**Estrada-Camarena et al., 2004 ; Martínez-Mota et al., 2008**). D'autres études portant sur l'effet des antagonistes des œstrogènes sur le comportement de nage devraient être menées afin de déterminer le rôle des œstrogènes au cours de la FST chez les rats jeunes et adultes. Aussi, il est bien connu que les œstrogènes possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Les études réalisées chez le rat et la souris ont mis en évidence la capacité de l'œstradiol à réduire les lésions tissulaires, tout en diminuant l'expression de cytokines Th1

impliquées dans la réponse inflammatoire aigüe, telles que le *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), le TNF α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (**Verdu et al., 2002 ; Houdeau et al., 2007**).

La progestérone est un stéroïde sexuel. Lorsqu'elle est synthétisée par le système nerveux à partir de la prégnénolone (**Craft et al., 2004**), elle semble avec ses métabolites neurostéroïdes (3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one ou alloprégnénolone) avoir un effet antidépresseur-like au cours de la nage forcée (**Andrade et al., 2010**). Elle semble également procurer à l'organisme une barrière protectrice en réponse aux changements perpétuels de l'environnement. Cette protection se fait par la production de stéroïdes dits neuroactifs (progestérone et ses métabolites). Il a été démontré que ces produits sont fortement impliqués dans l'installation de l'anxiété (**Frih et al., 2012; Neumann et al., 1998**) et de la dépression.

Par contre, la testostérone aurait des effets anxiolytiques et antidépresseurs (**Carrier et Kabbaj, 2012; Carrier et al., 2014**). Des rapports récents montrent que chez les mâles adultes, le stress augmente la testostérone éventuellement en stimulant la sécrétion de la gonadotrophine. Cependant des données actuelles plaident contre cette observation depuis les niveaux de cette hormone restent similaires entre les animaux témoins et ceux exposés à la FST.

Au cours de l'inflammation, les cytokines circulants suppriment les fonctions reproductrices en activant la sécrétion hypothalamique du CRH et en inhibant par conséquent la stéroïdogénèse ovarienne et testiculaire (**Martínez-Mota et al., 2011**). L'activation des cytokines pro-inflammatoires, en altérant la neurotransmission de la sérotonine, serait un des composants de la dépression. Mais, les cytokines anti-inflammatoires régulent la réponse inflammatoire en inhibant la production et l'action des cytokines inflammatoires (**Baumann et Gauldie., 1994**).

Chez les mâles, nous remarquons que la ligature du nerf sciatique provoque une augmentation de degré de dépression. Ceci est révélé dans nos résultats par une augmentation du temps d'immobilité chez les mâles ligaturés. Le niveau de dépression chez les mâles ligaturés serait la conséquence de l'intervention chirurgicale qu'a consisté en la ligature du nerf sciatique. Un grand nombre d'études en examinent la relation entre la dépression et l'inflammation (**Dantzer et al., 2008**), et entre l'anxiété et l'inflammation (**Kubzansky et Kawachi, 2000**). En outre, la recherche limitée sur l'état de l'anxiété et de l'inflammation a donné un modèle mixte de résultats. Apparemment, il existe une relation bidimensionnelle entre le système nerveux central et le système immunitaire. Plus récemment, des recherches ont montré que les

stéroïdes peuvent également se lier à des récepteurs de neurotransmetteurs spécifiques et modifier l'excitabilité neuronale (**Rupprecht, 2003**). Les molécules stéroïdes qui agissent comme des neuromodulateurs sont alors appelés neurostéroïdes.

Des preuves substantielles soutiennent l'existence de relations réciproques de régulation du système immunitaire par l'axe HPA, avec une attention particulière portée sur le neurone hypothalamique CRH, montré comme un principal point de jonction entre les événements périphériques et les réponses du système nerveux central. À cet égard, si la sécrétion de glucocorticoïdes est physiologiquement active en réponse à un processus inflammatoire, dans le but d'empêcher des dommages aux tissus consécutive de la réaction immunitaire, un certain nombre d'expérimentations indiquent que d'autres médiateurs de la réaction inflammatoire / immunitaire, y compris des cytokines, peuvent activer l'axe HPA par le neurone CRH hypothalamique (**Sapolsky et al., 2000**). En effet, la dépression a été associée à une augmentation des taux circulants de la cytokine pro-inflammatoire (**Zorrilla et al., 2001**).

Chez les femelles, la ligature du nerf sciatique ne semble pas provoquer une différence remarquable du niveau de dépression chez les animaux contrôles. Nous pensons qu'en réalité la ligature augmente le degré de dépression, cependant cette augmentation n'a pas été observable dans ce cas à cause de l'état hyper-dépressif des animaux contrôles. Ce qui a été expliqué par le rôle joué par les stéroïdes sexuels et partiellement par les œstrogènes sur l'état dépressif.

Nous tenons à attirer l'attention sur le fait que les modifications des temps d'immobilité observées au cours de la FST sont inversement proportionnelles aux temps de nage observés.

Comme cela a été rapporté dans plusieurs études, ceci signifie que la voie nerveuse est responsable de la survenue de la dépression par la voie de la 5HT, comme rapporté par **Albert et François (2010)**. Dans le même ordre d'idée nous avançons que l'activation de la 5-hydroxytryptamine (5HT), réduit l'immobilité par l'augmentation de la nage.

Au cours du test de la nage forcée ou *Forced Swimming Test* (FST), les antidépresseurs, produisant une élévation noradrénergique ou dopaminergique prédominante, réduisent l'immobilité par l'augmentation du temps d'escalade (**Kawaura et al., 2010**).

IV.5. CONCLUSION

Au terme de ce travail, qui a été réalisé sur des rats neuropathiques (ligature du nerf sciatique) et en adoptant le test de la nage forcée (FST) comme outil d'appréciation de la dépression, il ressort, que les rats ayant subis la ligature du nerf sciatique présentent un degré de dépression plus élevé. Ceci est bien visible chez les sujets mâles, où le temps d'immobilité est plus élevé chez les rats ligaturés par rapport à leurs homologues non ligaturés. Nous avons expliqué la survenue de cet état dépressif par l'inflammation survenue suite à l'intervention chirurgicale. Cette inflammation va susciter des modifications au niveau du système immunitaire avec une surproduction de cytokines pro-inflammatoires et que ces dernières seraient dépressinogènes comme il est rapporté dans plusieurs études.

La FST a également révélé une différence liée au sexe en rapport avec l'état de dépression. En effet, le temps d'immobilité mesuré chez les femelles contrôles est plus élevé que celui mesuré chez leurs homologues mâles. Ce qui veut dire que les femelles contrôles sont plus dépressives que les mâles et ce, en dehors de tout traitement. L'explication de cette différence réside, selon notre avis, dans la différence hormonale entre les mâles et les femelles. L'implication des stéroïdes sexuels dans les modifications de l'humeur a été beaucoup documentée. C'est ainsi, qu'il a été attribué à la testostérone un rôle antidépresseur. D'autres auteurs attribuent, par contre, à l'œstradiol des effets dépressinogènes. Un autre courant de recherche considère la progestérone et certains de ses dérivés comme des substances ayant des effets antidépresseur-like. Selon ces mêmes auteurs, ces dérivés de la progestérone, comme les prégénolones sont considérés comme des stéroïdes neuroactifs lorsqu'ils se trouvent au niveau du cerveau.

Chapitre V-
**Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et
d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle
Wistar traité à l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).**

Chapitre V- Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité à l'adjuvant incomplet de Freund (AIF).

Résumé:

Les troubles dépressifs majeurs sont couramment observés dans de nombreuses maladies médicales qui partagent les douleurs inflammatoires chroniques comme un dénominateur commun. Les douleurs qu'elle soit inflammatoires ou neuropathiques, celles qui sont provoquées par des lésions du système nerveux central ou périphérique, sont les plus difficiles à traiter du fait de leur résistance aux traitements antalgiques classiques.

Dans notre étude, nous avons choisi un modèle de douleur neuropathique (ligature du nerf sciatique) associé à une injection intradermique de 0.02ml de AIF dans le but d'aboutir à une activation du système immunitaire innée chez des rats mâles Wistar subissant subséquentement le test de nage forcée (FST).

Notre étude a été complétée par une étude endocrinologique mettant en relief l'importance des stéroïdes sexuels sur les fluctuations de la dépression par les dosages hormonaux (testostérone et œstradiol).

Nos résultats ont montré que : La ligature provoque une augmentation hautement significative de la dépression après 10 jours post opératoires. Ceci est révélé par l'augmentation du temps d'immobilité au cours de la FST, Cette dépression signalée chez les ligaturés tend à être atténuée avec le temps où l'on constate une diminution significative vingt jours après la ligature.

Le traitement à l'AIF agit en 2 phases : la 1ère où l'on remarque un comportement dépressif-*like* due à l'activation du système immunitaire SI qui provoque une inflammation et une 2ème phase où on constate un comportement moins dépressif antidépressif-*like* où l'inflammation disparaît au bout de 20 jours.

Ceci est également associé à des variations hormonales où l'on observe une augmentation significative au niveau de la testostérone chez les sujets ligaturés et traités (AIF) et une diminution significative de l'œstradiol.

En l'occurrence ces résultats nous emmènent à mettre en évidence l'existence d'un lien neuro-immuno-endocrinien qui intervient pour permettre à l'organisme d'en bénéficier et rétablir l'homéostasie. En cas de perturbation, ces systèmes vont s'associer pour provoquer des troubles dépressifs voire une dépression majeure.

Mots clés :

AIF, Douleur neuropathique, Inflammation, Testostérone, Œstradiol, Dépression.

ملخص:

تعتبر اضطرابات الاكتئابية الرئيسية شائع في كثير من الأمراض الطبية مع الالتهاب كقاسم مشترك. ألم ما إذا كانت التهابات أو الأعصاب، تلك التي تسببها الآفات في الجهاز العصبي المركزي أو الطرفي هي أصعب لعلاج بسبب مقاومتهم للعلاجات المسكنة التقليدية.

في دراستنا، اخترنا نموذجاً للألم الاعتلال العصبي (العصب الوركي ربط (المرتبطة الحقن داخل الأدمة للـ 0.02 ml من AIF من أجل تحقيق تنشيط الجهاز المناعي الفطري في الفئران الذكور ويستار بعد ذلك يجري اختبارها السباحة القسري (FST).

تم الانتهاء من الدراسة لدينا من قبل دراسة الغدد الصماء تسليط الضوء على أهمية المنشطات الجنسية على تقلبات اكتئاب عن طريق فحوصات هرمونية (هرمون تستوستيرون واستراديول).

أظهرت نتائجنا أن: ربط يسبب زيادة كبيرة للغاية في الأيام ما بعد الجراحة الاكتئاب 10. وكشف ذلك عن طريق زيادة الوقت الجمود في FST، هذا الاكتئاب التي أعلن عنها في ligated يميل إلى أن تكون مخففة مع مرور الوقت أو أن هناك انخفاضاً كبيراً عشرين يوماً ربط التالية.

العلاج مع AIF هي في مراحل 1: 2 أو نلاحظ السلوك الاكتئابي مثل نظراً إلى تفعيل SI التي تسبب الالتهاب ومرحلة 2 أو هناك سلوك أقل الاكتئابي-المضادة للاكتئاب مثل أو التهاب يختفي بعد 20 يوماً.

ويرتبط هذا أيضاً مع التغيرات الهرمونية أو أن هناك زيادة كبيرة في مستوى هرمون التستوستيرون في ligated والموضوعات (AIF) وانخفاض كبير من استراديول.

في هذه الحالة هذه النتائج تقودنا إلى تسليط الضوء على وجود صلة يتدخل العصبية المناعة والغدد الصماء لتتيح للمنظمة الاستفادة منه واستعادة التوازن. في حالة تعطل سوف يسبب ترتبط هذه الأنظمة مع اضطرابات اكتئابية لرؤية الاكتئاب الشديد.

الكلمات المفتاحية:

AIF، الأعصاب الألم والالتهاب، هرمون تستوستيرون، استراديول، والاكتئاب

Abstract

Major depression disorders are commonly seen in many medical diseases that share chronic inflammatory pain as a common denominator. Pains whether inflammatory or neuropathic, those caused by damage to the central or peripheral nervous system are the most difficult to treat due to their resistance to conventional analgesic treatments.

In our study, we chose a model of neuropathic pain (sciatic nerve ligation) associated with intradermal injection of 0.02 ml of Freund's Incomplete Adjuvant (AIF) in order to achieve an activation of the innate immune system in male Wistar rats subsequently being tested of forced swimming (FST).

Our study was completed by an endocrinological study highlighting the importance of sex steroids on the fluctuations of depression by hormonal assays (testosterone and estradiol).

Our results showed that the ligation causes a highly significant increase in the depression 10 days postoperative. This is revealed by increased immobility time in the FST. This depression reported among ligated tends to be mitigated over time there has been a significant decrease in twenty days following ligation.

Treatment with AIF is in 2 phases: 1st where we see a depressive-like behavior due to the activation of the immune system that causes inflammation and a 2nd phase where there is a less depression antidepressant-like and the inflammation disappears after 20 days.

This is also associated with hormonal changes or there is a significant increase in the level of testosterone in subjects ligated and treated (AIF) and a significant decrease of estradiol.

These results then takes us to highlight the existence of neuro-immune-endocrine link that acts to benefit the body and restore homeostasis. In case of disruption these systems associated will cause depressive disorders also a major depression.

Keywords: AIF, Neuropathic Pain, Inflammation, Testosterone, Estradiol, Depression

V.1.INTRODUCTION

La réponse inflammatoire chez un sujet normal est un moyen capital de protection contre les agents bactériens et se caractérise par un équilibre naturel entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires (**Munck, 2000**). Les quatre signes cardinaux : rougeur, chaleur, œdème et douleur démontrent la mobilisation des défenses de l'hôte (**Clarck et al., 1994**). Aujourd'hui, La discipline fait une distinction fondamentale entre l'inflammation aiguë et l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë comprend la réponse immédiate et précoce à l'agression. L'inflammation chronique persiste lorsque le facteur déclenchant, ou la stimulation, persiste (**McGeer et Rogers, 1992**). Donc L'inflammation périphérique peut atteindre directement le Système Nerveux Central (SNC) par l'intermédiaire des médiateurs de l'inflammation (interleukines et prostaglandines) qui pénètrent le cerveau par les zones dépourvues de la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) (**Calvino et al., 2007**).

La douleur peut être considérée comme participant à une fonction protectrice, un signal d'alarme, à la suite d'une lésion ou d'un traumatisme d'un tissu périphérique de l'organisme engendrant une réaction de défense inflammatoire. **Kuner (2010)** a rapporté que la douleur est un des symptômes les plus courants rencontrés à la clinique, et la douleur inflammatoire représente un type important de la douleur.

Cette dernière peut se prolonger dans le temps et engendrer des douleurs inflammatoires chroniques, mais peut aussi concerner un tissu nerveux engendrant une lésion neuropathique, et donc des douleurs neuropathiques chroniques. La douleur perd alors sa signification de signal d'alarme pour devenir une maladie en soi, un véritable syndrome.

Par ailleurs, plus de la moitié des patients qui souffrent de douleur neuropathique développent des troubles de l'humeur tels que la dépression et l'anxiété étant donné que le stress externe est largement reconnu comme étant un facteur prédisposant et facteur déclenchant de la dépression (**Dellarole et al., 2014; Ali Rachedi et al., 2015**). Car il est maintenant prouvé que la dépression est accompagnée par l'activation du système immunitaire, inflammatoire et le stress oxydatif (**Kubera et al., 2011**). Notamment lorsque cette inflammation neuronale est prolongée du fait d'une cause inconnue, surtout non diagnostiquée, comme une infection chronique ancienne et symptomatique, elle met en jeu nos défenses cellulaires et humorales, créant une perturbation biologique génératrice de stress oxydant. Par "stress oxydatif", il faut comprendre une agression chimique oxydative, une oxydation des constituants de notre

organisme, due à un excès de molécules particulièrement nocives que l'on appelle les radicaux libres de l'oxygène (**Djemli et al., 2015; Fraia et al., 2015**). Cette oxydation dénature les protéines, les lipides, les sucres et même l'ADN, et par là les membranes cellulaires (**Djemli et al., 2015**). Il a été démontré également que la dépression est une des causes primaires d'une hyperactivité de l'axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien (HPA) caractérisée par une résistance au rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes de cet axe (**Frih et al., 2009**). Ce dernier serait un des acteurs principaux de la réponse au stress (**Rubin et al., 1966**).

Aujourd'hui, les douleurs qu'elles soient inflammatoires ou neuropathiques, celles qui sont provoquées par des lésions du système nerveux central ou périphérique, sont les plus difficiles à traiter du fait de leur résistance aux traitements antalgiques classiques. Les traitements utilisés présentement font appel à des classes thérapeutiques non spécifiquement ciblées sur la douleur, en particulier des antidépresseurs. Leur efficacité limitée ne repose en fait que sur des observations empiriques. Une meilleure connaissance des processus physiopathologiques, sous-tendant les douleurs neuropathiques, constitue un préalable à toute innovation thérapeutique (**M'Dahoma, 2013**).

C'est à cette fin qu'on s'est appliqué à développer des modèles de douleurs neuropathiques (**Ali Rachedi et al., 2015; Zaafour et al., 2015**) chez le rat en réalisant une ligature au niveau du nerf sciatique pour étudier les caractéristiques comportementales à travers les paramètres du test de la nage forcé (temps de nage, d'immobilité et l'escalade), fonctionnelles, cellulaires et biochimiques par les dosages des paramètres hormonaux (testostérone et œstradiol). Nous avons donc élaboré ce protocole expérimental dans le but de mettre en évidence l'activation du système immunitaire par une injection intradermique de l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF) dans le but de démontrer les liens existant entre les systèmes nerveux, immunitaire et endocrinien.

V.2.MATERIEL ET METHODES :

V.2.1. Matériel biologique :

Notre matériel biologique est le rat mâle blanc de la souche Wistar, âgé d'environ six (06) mois et de poids moyen de $250g \pm 10g$ provenant de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les animaux ont été élevés dans des cages en polyéthylène. Ils ont subi une période d'adaptation de quatre (04) semaines dans les conditions environnementales de la salle d'expérimentation (photopériode naturelle, humidité, température, etc ...). Leur nourriture était composée de maïs, d'orge, de lait et de compléments vitaminés. L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*.

Les rats ont été 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 ont été manipulés par les mêmes expérimentateurs. Les rats ont été répartis en trois (03) lots expérimentaux qui subissent une batterie de tests comportementaux.

Un lot contrôle ;

Un lot qui a subi une ligature du nerf sciatique sous anesthésie générale (Lig) ;

Un lot qui a subi une injection intradermique de 0.02 ml de l'adjuvant incomplet de Freund (IFA).

V.2.2. Ligature du nerf sciatique « *sciatic nerve injury* »

Cf. Chapitre III.2.3

1. Lotissement des rats

**Contrôle
(n=08)**

**Ligature
(n=08)**

**Lig+AIF
(n=08)
(J14 après ligature)**

2. Ligature du nerf sciatique

Anesthésie

Chirurgie

Période post-chirurgie

3. Paramètre mesurés

**Poids corporel
(Chaque 5 jours)**

**Prélèvement sanguin
entre 8h et 10h du matin**

**Nage forcée
(2 sessions)**

4. Batterie de tests

La batterie de tests se fait chaque 10 jours pour les 03 lots expérimentaux. Le calcul commence à partir de j 0 après la ligature du nerf sciatique pour le lot ligature et lot contrôle et à partir du 14ème jour du traitement pour le lot lig+AIF.

5. Dosage hormonal

**Dosage hormonal par ECLIA
Dosage de la 1'œstradiol**

Dosage de la testostérone

Euthanasie des animaux deux semaines après la dernière batterie de tests

Figure V.1 : Protocole expérimental.

V.2.4. Méthodes :

V.2.4.1. Traitement par l'AIF (Adjuvant Incomplet de Freund) :

L'adjuvant incomplet de Freund (IFA) est constitué d'huile minérale et d'émulsifiant monoléate de mannide. Cette adjuvant, provoque une immunogénicité améliorée en augmentant l'inflammation locale, stimule la prolifération de lymphocytes non spécifiques et la prolongation de la persistance de l'antigène (**Singh and O'Hagan, 1999**). Dans ce contexte, l'adjuvant joue un rôle important car il améliore le recrutement de divers types de cellules du système immunitaire. Il induit une expression accrue de cytokines inflammatoires endogènes (**Kensil et al., 2004**).

L'AIF utilisé provient de l'Institut Pasteur d'Alger. Dans notre étude, il a été injecté par voie intradermique au niveau de la queue à une dose de 50µl/rat qui a été réduite à 2µl/rat pour les besoins du protocole, à savoir une stimulation de la réponse immunitaire (**Zhang et al., 2001**).

V.2.5. Étude comportementale : procédure de la nage forcée (*Forced Swimming Test*)

Cf. Chapitre II.2.7.2

V.2.6. Collecte des organes et des échantillons sanguins

Les prélèvements sanguins se font par voie rétro-orbitaire, puis centrifugés à 5000 tours/minute. Le sérum est aliquoté jusqu'au moment du dosage hormonal de la testostérone et l'oestradiol. Les mesures ont été faites par le kit de test ELISA classique BIOTECH, avec un lecteur TECAN ELISA équipé d'un logiciel d'ordinateur Magellan qui calcule automatiquement la gamme standard et fournit la valeur de l'hormone à l'unité souhaitée directement.

V.2.7. Dosage de la testostéronémie et d'oestradiolémie par la méthode ECLIA

V.2.7.1. Dosage de la testostérone plasmatique par la méthode ECLIA

La testostérone est une hormone sexuelle mâle produite essentiellement à un taux de 95% par les cellules de Leydig des testicules, aussi nommées cellules interstitielles, mais une faible quantité (5 %) est sécrétée également par la corticosurrénale. Chimiquement, la testostérone est un stéroïde contenant 19 carbones (C19). La première étape de la biosynthèse des stéroïdes débute par la conversion du cholestérol en prégnénolone (précurseur des hormones stéroïdiennes naturellement synthétisées dans notre corps à partir du cholestérol).

Domaine d'utilisation :

Test immunologique pour la détermination quantitative *in vitro* de la testostérone dans le sérum et le plasma humains. Ce test par électro-chimi-luminescence « ECLIA » s'utilise sur les analyseurs Elecsys et cobas e 411.

Principe :

Principe de compétition. Durée totale du cycle analytique : 18 minutes.

- 1^{ère} incubation : 20 µL d'échantillon sont incubés avec un anticorps monoclonal anti-testostérone biotinylé spécifique. Les sites de liaison de l'anticorps marqué sont occupés par l'analyte contenu dans l'échantillon (en fonction de sa concentration).
- 2^{ème} incubation : les microparticules tapissées de Streptavidine, purifiée à partir de la bactérie *Streptomyces avidinii*, est un dérivé de testostérone marqué au ruthénium sont ajoutés à la cuvette réactionnelle.

Le complexe est fixé à la phase solide par une liaison streptavidine-biotine.

- Le mélange réactionnel est transféré dans la cellule de mesure, les microparticules sont maintenues au niveau de l'électrode par un aimant. L'élimination de la fraction libre est effectuée par le passage de ProCell. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur (PM).
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en deux points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

Calcul des résultats :

L'analyseur calcule automatiquement la concentration en analytes de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés au choix en ng / ml, ng / dl ou nmol / l.

Facteurs de conversion :

$$\text{ng / ml} \times 3,47 = \text{nmol / l}$$

$$\text{ng / ml} \times 100 = \text{ng / dl}$$

$$\text{nmol / l} \times 0,288 = \text{ng / ml}$$

V.2.7.1. Dosage de l'œstradiol plasmatique par la méthode ECLIA

L'œstradiol est un dérivé naturel du métabolisme du cholestérol (*via* la testostérone) qui est nécessaire au maintien de la fertilité et des caractères sexuels secondaires chez la femme.

Une production endogène d'œstradiol (17 β -estradiol ou « E2 ») existe aussi dans le cortex visuel du cerveau et dans le cortex visuel primaire, avec des récepteurs situés dans la même région, dont la fonction n'est pas encore comprise. Cet œstradiol affecte le traitement perceptif des indices visuels.

Caractéristiques :

Elecsys Estradiol II CalSet I est un sérum humain lyophilisé auquel a été ajouté de l'œstradiol à deux niveaux de concentration.

Le *CalSet* peut être utilisé avec tous les lots de réactifs. Les valeurs exactes des calibrateurs sont spécifiques d'un lot et sont mémorisées dans le code-barres des godets. Elles figurent également sur la fiche « *Calibrator Barcode* » (ou la fiche électronique correspondante).

Préparation :

- Dissoudre soigneusement le contenu d'un flacon à l'aide d'exactly 1,0 ml d'eau distillée ou désionisée. Laisser reposer pendant quinze (15) minutes dans un flacon bouché pour la reconstitution.
- Mélanger avec précaution en évitant la formation de mousse. Transvaser le calibrateur reconstitué dans des godets vides à bouchon étiquetés (*CalSet Vials*) ou flacons *CalSet*.
- Identifier les godets utilisés avec les étiquettes jointes au coffret. Conserver immédiatement les aliquotes à -20 °C.
- Effectuer une seule calibration par aliquote.

Conservation et stabilité :

- La conservation se fait entre 02 et 08 °C.
- Les calibrateurs lyophilisés sont stables jusqu'à la date de péremption indiquée.
- Stabilité des calibrateurs reconstitués : à -20 °C pendant trois (03) mois (une seule congélation possible) sur les analyseurs, entre 20 et 25 °C à usage unique.

Réalisation du test :

Placer les calibrateurs reconstitués dans les godets étiquetés adaptés à l'analyseur sur le plateau échantillons. Toutes les informations nécessaires à la calibration du test sont mémorisées dans les codes-barres joints au coffret. Le code-barres des réactifs et le code-barres figurant sur l'étiquette des calibrateurs doivent être saisis. S'assurer avant l'analyse que la température des calibrateurs se situe entre 20 et 25 °C.

V.2.8. Analyse statistique des résultats

Le Graph Pad Prism 5 pour Windows version 5.01 a été utilisé pour faire l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Elles ont été examinées par une analyse de la variance ANOVA 1 ou ANOVA 2 suivies par un *post hoc test* de Newman-Keuls et Benferroni. Les résultats sont considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

V.3. RESULTATS

V.3.1. Effet de la ligature et de l'AIF sur le comportement *dépressif-like* au test de la nage forcée.

L'ANOVA1 pour le temps de nage (A) a signalé un effet significatif du traitement ($F=6.327$, $R\ square= 0.5686$, $p <0.0007$).

Le test de Newman-Keuls a signalé une augmentation significative du temps de nage chez les lots : Lig vs Lig10 ($q=5.096$, $p <0.05$), Lig vs Lig20 ($q=7.007$, $p <0.05$), Lig vs AIF20 ($q=4.282$, $p <0.05$). Par contre, il a signalé une diminution significative chez les lots : AIF10 vs LIG20 ($q=4.848$, $p <0.05$), Lig vs contrôle ($q=5.388$, $p <0.05$).

L'ANOVA1 pour le temps d'immobilité (B) a signalé un effet significatif du traitement ($F=14.74$, $R\ square=0.7544$, $p <0.0001$).

Le test de Newman-Keuls a signalé une augmentation significative du temps d'immobilité chez les lots : contrôle vs Lig ($q=10.88$, $p <0.05$), contrôle vs AIF10 ($q=6.322$, $p <0.05$), contrôle vs Lig10 ($q=5.213$, $p <0.05$) et Lig20 vs AIF10 ($q=3.814$, $p <0.05$), ainsi qu'une diminution significative chez les lots : AIF02 vs Lig ($q=8.619$, $p <0.05$), AIF20 vs AIF10 ($q=4.065$, $p <0.05$), Lig10 vs Lig ($q=8.368$, $p <0.05$), AIF10 vs Lig ($q=4.553$, $p <0.05$) et Lig10 vs Lig ($q=5.662$, $p <0.05$).

L'ANOVA1 pour le temps d'escalade (C) n'a pas signalé d'effet significatif du traitement ($F=1.378$, $R\ square=0.2230$, $p <0.2677$).

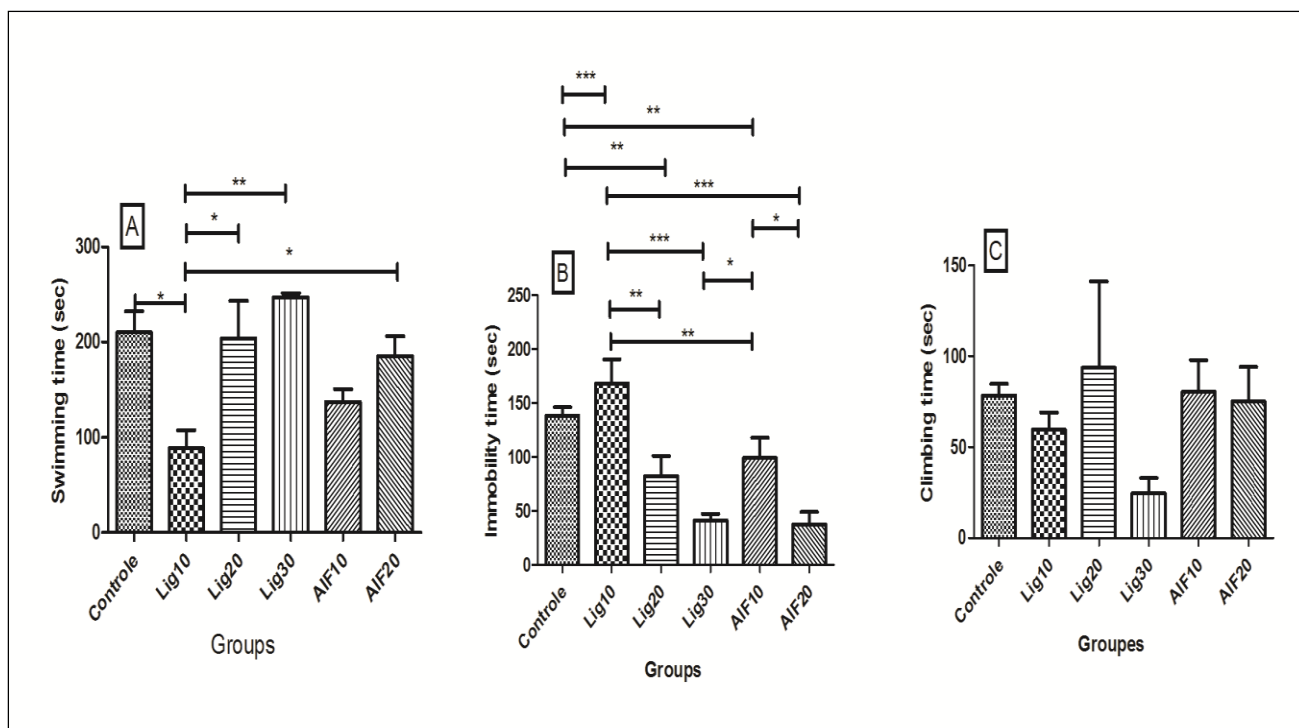


Figure V.2. Effet de l'injection de l'IFA et de la ligature sur les paramètres du test de la nage forcée chez les rats Wistar. L'analyse de la variance, le test de Newman-Keuls et le *post hoc* test de comparaison multiple ont été utilisés pour comparer chaque groupe à l'autre. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

V.3.2. Effets de la ligature et de l'AIF sur les paramètres biochimiques

V. 3.2.1. Variation du niveau de testostérone plasmatique (ng/ml)

L'ANOVA1 a révélé un effet significatif du traitement sur le niveau de la testostérone ($F = 9.183$, $R^2 = 0.4440$). L'AIF a augmenté de manière significative le niveau de testostérone (Contrôle vs Lig AIF : $q = 5.117$, $p < 0.05$), (Lig vs Lig AIF : $q = 5.733$, $p < 0.05$).

L'ANOVA1 a révélé un effet significatif du traitement sur le niveau de l'œstradiol ($F = 27.50$, $R^2 = 0.7857$). La ligature a diminué de manière significative le niveau de l'œstradiol (Lig vs Lig AIF : $q = 5.733$, $p < 0.05$), Contrôle vs Lig AIF : $q = 5.117$, $p < 0.05$).

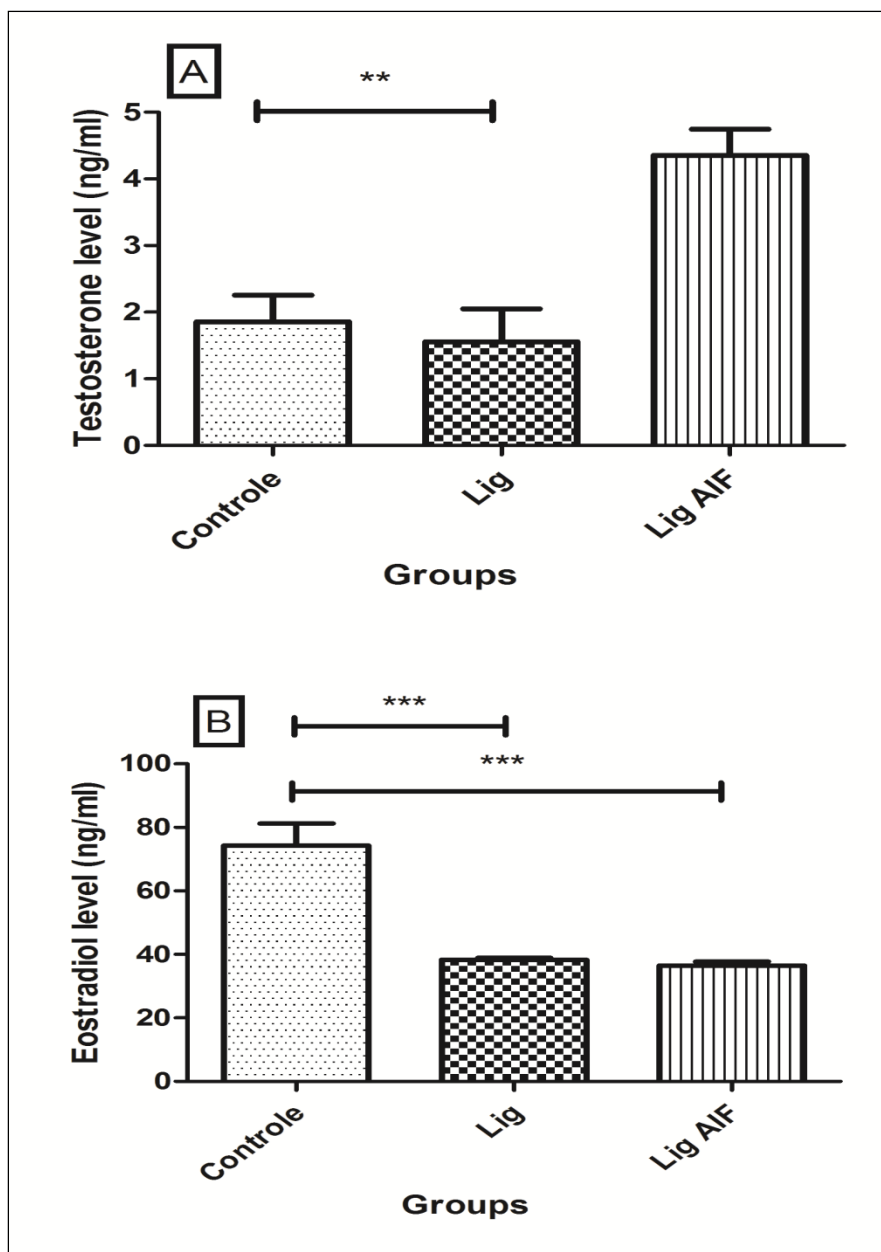


Figure V.3. Variation du niveau de la testostérone (ng / ml) (A) et de l'eostradiol (ng / ml) (B) chez les rats témoins, traités avec l'AIF et ligaturés. L'analyse de la variance et le Newman-Keuls test et le *post hoc* test de comparaison multiple ont été utilisés pour comparer chaque groupe à l'autre (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

V.4. DISCUSSION

Au terme de notre travail, les résultats obtenus concernant le degré de dépression montrent que : la ligature provoque une augmentation hautement significative de la dépression. Ceci est révélé par l'augmentation du temps d'immobilité au cours de la FST (Figure V.2). Nous estimons que cette dépression est induite par l'inflammation due à la ligature du nerf sciatique.

La FST est un modèle largement utilisé dans lequel un changement de comportement est induit par un stress aigu (**Porsolt et al., 1978**) . Si le temps d'immobilité diminue ou augmente ceci est interprété comme étant des actions dépressives ou antidépressives (**Frih et al., 2013**). En plus de l'immobilité, les animaux montrent des comportements actifs qui reflètent leur intérêt pour tenter activement d'éviter cette situation aversive. En effet, il a été rapporté que dans une grande proportion d'individus la lésion du système nerveux (ligature du nerf sciatique) peut conduire à une douleur neuropathique chronique débilante, qui est considérée actuellement comme étant un trouble neuro-immunitaire, puisque les données récentes indiquent une implication critique des réponses immunitaires innées et adaptatives en réponse à une lésion nerveuse (**Frih et al., 2013**).

L'activation des cellules immunitaires (gliales) dans le nerf lésé provoque la libération des cytokines pro- et anti-inflammatoires (**Patterson, 2011**). **Smith (1991)** était l'un des premiers à formuler une hypothèse que les cytokines pro- inflammatoires IL-1 et IL-6 (interleukines), IFN γ (interféron) et les TNF alpha (*Tumor Necrosis Factor*) dans le sérum, ont été assimilés aux symptômes principaux de dépression (**Pariante et Miller, 2001**). Cette dépression signalée chez les ligaturés, tend à être atténuée avec le temps où l'on constate une diminution significative de celle-ci, vingt jours (20) après la ligature. Nous justifions cette situation par le fait que les sujets ligaturés se sont adapté à l'inflammation avec l'intervention de l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HPA) *via* les glucocorticoïdes que cette réparation à été accomplie.

L'activation de l'axe HPA est déclenchée par une augmentation de la sécrétion de CRH (*Corticotrophin Releasing Hormone*) due aux cytokines pro-inflammatoire (**Gillies et al., 1982 ; Rivier et Vale, 1983**). Le CRH stimule l'hypophyse à sécréter l'ACTH (*Adreno corticotropin hormon*) dans la circulation sanguine. Cette dernière, favorise la synthèse des glucocorticoïdes (cortisol chez l'Homme et la corticostérone chez les rongeurs). L'augmentation des glucocorticoïdes régule, de façon négative, l'activité de l'axe HPA, et donc sa propre production, à travers un mécanisme de rétroaction négative. Ils inhibent la

libération d'ACTH, la synthèse et libération de CRH (**Hinz et Hirschelmann, 2000; Gary et Pilyoung, 2013**).

Malgré cette adaptation signalée précédemment, nous constatons qu'après trente (30) jours un certain degré de dépression résiduelle persiste toujours. Ceci explique l'absence dans l'organisme de moyens endogènes suffisants pour vaincre la dépression. À ce titre, il a été rapporté que l'inflammation peut se prolonger dans le temps et engendrer des douleurs inflammatoires chroniques, mais peut aussi concerner un tissu nerveux engendrant une lésion neuropathique, et donc des douleurs neuropathiques chroniques : la douleur perd alors sa signification de signal d'alarme pour devenir une maladie en soi, un véritable syndrome (**Porreca et al., 2002**). Nous constatons alors que les sujets ligaturés semblent être installés durablement dans un processus de dépression chronique. Dans le souci de trouver des moyens pour combattre la neuro-inflammation chronique, et par conséquent la dépression ; nous avons essayé chez des sujets ligaturés une stimulation du système immunitaire par l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF). Il ressort de cet essai que l'AIF provoque dans une première étape une inflammation qui disparaît au bout de vingt (20) jours.

L'AIF provoque une immunogénicité améliorée en augmentant l'inflammation, en stimulant la prolifération de lymphocytes non spécifiques, et la prolongation de la persistance de l'antigène (**Singh, 2007**). L'administration de l'AIF est à considérer à court et à long terme. À court terme, l'inoculation de l'AIF provoque une réaction immunitaire non spécifique qui favorise la production du TNF, de l'interféron l' $IFN\gamma$, de l'IL-6, de l'IL-17, de l'IL-4, l'IL-10, l'IL-1 β , et l'IL-2 (**Vitoriano-Souza et al., 2012**). Parmi les rôles de l' $IFN\gamma$, c'est l'activation de l'IDO (l'indoléamine 2,3-dioxygénase) cette enzyme est fortement exprimée, chez l'Homme et le rongeur, par les cellules dendritiques et les macrophages ainsi que par les cellules endothéliales cérébrales, les astrocytes, la microglie et les neurones (**Carlin et al., 1989 ;Guillemin et al., 2005**). L'IDO alors inhibe la conversion du tryptophane qui est un acide aminé précurseur de la biosynthèse de la 5-HT (5-Hydroxytryptamine). Une diminution des taux de Tryptophane ayant pour conséquence une réduction de la synthèse de 5-HT et cette baisse pourrait être impliquée dans la mise en place des troubles de l'humeur et provoquer également une dépression (**Andre et al., 2008**). Ainsi, cette réaction immunitaire à long terme change de forme et l' $IFN\gamma$ n'est plus exprimée, ce qui induit une inhibition de l'IDO et ainsi un rétablissement de la conversion du tryptophane d'où la biosynthèse de la 5-HT, en l'occurrence une augmentation du métabolisme de celle-ci et s'ensuit d'une diminution des troubles dépressifs.

Concernant le temps d'immobilité, nos résultats révèlent une diminution significative de celui-ci au détriment du temps de nage. Cette dépression est liée à une réduction de la transmission monoaminergique, en particulier la sérotonine (5-HT) et de la noradrénaline (NA) (**Schildkraut, 1965**), ainsi que par une augmentation de la transmission dopaminergique dans le Système Nerveux Central (SNC) (**Schatzberg et al., 1985**).

Notre étude a été complétée par une étude endocrinologique mettant en relief l'importance des stéroïdes sexuels sur les fluctuations de l'état de dépression. Nos résultats (Figure V.3) montrent une augmentation significative du niveau de la testostérone chez les sujets AIF+lig20 et une diminution significative de l'œstradiol chez ces mêmes sujets, ce qui nous permet de supposer que c'est l'immunité innée qui a interpellé ces mécanismes neurophysiologiques entraînant l'exacerbation d'où l'atténuation de ces troubles dépressifs. Ceci veut dire que la testostérone jouerait un rôle d'antidépresseur, alors que l'œstradiol aurait un rôle dépressinogène.

La participation des stéroïdes sexuels dans les troubles de l'humeur a souvent été documentée et les perturbations dans les concentrations circulantes des hormones ovariennes produit un comportement de la dépression (**Frye et Walf., 2009**), de plus les changements comportementaux associés avec le cycle œstral, ont clairement montré une réduction de l'immobilité et un comportement actif plus élevé pendant le proestrus –œstrus (**Contreras et al., 1998**). De ces observations, il semble ressortir que les œstrogènes auraient un effet dépressif (**Verdu et al., 2002**). Dans ces catégories, les sources d'œstradiol peuvent être les gonades depuis les ovaires et les testicules qui ont une teneur élevée en aromatasase (enzyme qui transforme les androgènes en œstrogènes). Les concentrations d'œstradiol chez les femelles adultes et les rats prépubères pourraient être liées à la réduction de l'immobilité et de son augmentation observée durant l'essai, révélant l'activation du système sérotoninergique (**Estrada-Camarena et al., 2006**) L'administration de 17 β -œstradiol chez la femelle ou chez les rats mâles fait augmenter la nage et réduit l'immobilité dans la FST; l'antagoniste du récepteur 5-HT_{1A}, bloque l'effet antidépresseur de l'œstradiol dans la FST (**Estrada-Camarena et al., 2004; Martínez-Mota et al., 2008**). D'autres études portant sur l'effet des antagonistes des œstrogènes sur le comportement de nage devraient être menées afin de déterminer le rôle des œstrogènes au cours de la FST chez les rats jeunes et adultes. Aussi, il est bien connu que les œstrogènes possèdent également des propriétés anti-inflammatoires. Les études réalisées chez le rat et la souris ont mis en évidence la capacité de l'œstradiol à réduire les lésions tissulaire, tout en diminuant l'expression de cytokines Th1 impliquées dans

la réponse inflammatoire aigüe, telles que le *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF), le TNF α , l'IL-1 β et l'IFN- γ (**Houdeau et al., 2007** **Martínez-Mota et al., 2008**).

Par contre, la testostérone aurait des effets anxiolytiques et antidépresseurs (**Carrier and Kabbaj, 2012 ; Carrier et al., 2015**). Des rapports récents montrent que chez les mâles adultes, le stress augmente la testostérone éventuellement en stimulant la sécrétion de la gonadotrophine. Cependant, des données actuelles plaident contre cette observation depuis les niveaux de cette hormone restent similaires entre les animaux témoins et ceux exposés à la FST. Au cours de l'inflammation, les cytokines circulantes suppriment les fonctions reproductrices en activant la sécrétion hypothalamique du CRH et en inhibant par conséquent la stéroïdogénèse ovarienne et testiculaire (**Martínez-Mota et al., 2011**) L'activation des cytokines pro-inflammatoires, en altérant la neurotransmission de la sérotonine, serait un des composants de la dépression, mais les cytokines anti-inflammatoires régulent la réponse inflammatoire en inhibant la production et l'action des cytokines inflammatoires (**Baumann et Gauldie, 1994**).

V.5. CONCLUSION

Notre étude comporte une investigation expérimentale permettant d'évaluer et d'explorer l'effet de la ligature du nerf sciatique et de l'injection de l'AIF en intradermique.

Les résultats obtenus concordent avec ceux de certains auteurs, à savoir l'effet de la stimulation de l'inflammation par la ligature du nerf sciatique, l'AIF par son action réparatrice sur les troubles comportementaux dépressifs engendrés par le test de la nage forcée.

À travers ces résultats nous avons pu constater que :

- Les mâles inclus dans notre expérimentation sont susceptibles d'acquérir un comportement dépressif suite à une situation dépressinogène provoquée par la ligature du nerf sciatique (neuro-inflammation) et ceci est révélé par le test de la nage forcée.
- Les sujets ligaturés ont montré une situation d'adaptation à la neuro-inflammation qui est justifiée par la diminution de la dépression vingt jours après la ligature.
- La neuro-inflammation peut se prolonger dans le temps et devenir chronique.
- Nous avons constaté à travers les résultats de la nage forcée que l'administration de l'AIF à 0.02 ml/rat aurait un effet sur la dépression causée par la ligature du nerf sciatique un effet réparateur au bout de 20jours
- Les stéroïdes sexuels ont un effet sur les fluctuations de la dépression, d'où on peut conclure que la testostérone jouerait un rôle d'antidépresseur et que l'œstradiol aurait un rôle dépressinogène.

Chapitre VI-

**Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et
d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle
Wistar traité au BCG.**

Chapitre VI- Étude des variations des niveaux de la testostéronémie et d'oestradiolémie chez le modèle neuropathique rat mâle Wistar traité au BCG.

Résumé

La moitié des patients qui souffrent de douleurs neuropathiques développent des troubles de l'humeur tels que la dépression et l'anxiété, mais les mécanismes qui sous-tendent cette comorbidité ne sont pas entièrement compris.

Nous avons opté pour une démarche expérimentale basée sur l'activation du système immunitaire chez des rats Wistar dans le but d'essayer de montrer qu'il existe des liens entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien d'une part, et tenter d'en expliquer les mécanismes de mises en jeu dans l'apparition des troubles de l'humeur chez des animaux ligaturés (lésion du nerf sciatique) et traités au vaccin bilié de Calmette et Guérin d'autre part, le plus souvent dénommé vaccin BCG et à l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF).

Ainsi, nous avons provoqué une douleur neuropathique associée à une activation du système immunitaire par injection de 0.02 ml de BCG ou 0.02 ml de AIF ou alors une immuno-inhibition par injection de 0.02 ml de Ciclosporine (CsA).

Les moyens d'investigation ont été la mesure du niveau de la dépression par le test de Porsolt ou test de la nage forcée (*Forcing Swimming Test*) et le dosage des hormones stéroïdes (testostérone et œstradiol) par la méthode Eclia.

Nos résultats ont montré que la ligature n'a pas d'effets sur la nage forcée après 10 et 20 jours post-opératoires, alors qu'au bout de 30 jours elle exerce un effet antidépresseur.

Le traitement au BCG agit en deux temps, une 1^{ère} phase précoce dépressogène-*like* et une 2^{ème} phase tardive antidépressif-*like*.

Ces effets sont associés aux variations hormonales (testostérone et œstradiol). L'activation du système immunitaire (BCG, AIF) fait augmenter le niveau de testostérone et diminuer celui de l'œstradiol. À l'inverse, l'immunosuppression (CsA) contrecarre ces effets et entraîne une diminution de testostérone et une augmentation de l'œstradiol.

Il existe des mécanismes neuro-immuno-endocriniens qui sont responsables des effets délétères ou bénéfiques chez l'organisme vivant. À défaut, ces mécanismes vont se solder par une perturbation de l'homéostasie et déboucher sur des troubles de l'humeur.

Mots clés : Ligature du sciatique, BCG, Test de la nage forcée, Testostérone, Oestradiol, Dépression.

الملخص

نصف المرضى الذين يعانون من ألم الاعتلال العصبي تطوير اضطرابات المزاج مثل الاكتئاب والقلق، ولكن لم يتم فهم الآليات التي تكمن وراء هذا الاعتلال المشترك بالكامل. اخترنا هذا النهج التجريبي القائم على تفعيل جهاز المناعة في فئران ويستار في محاولة لإظهار أن هناك روابط بين نظام المناعة والجهاز الهرموني العصبي أولاً، ومحاولة لشرح آليات جلبت إلى اللعب في تطوير اضطرابات المزاج في الحيوانات ligated (إصابة العصب الوركي) وتعامل مع لقاح BCG من ناحية أخرى، وغالباً ما يشار إليها باسم BCG و مساند فرويند الناقص (IFA). وبالتالي، فإننا الناجم عن ألم الأعصاب المرتبطة تفعيل الجهاز المناعي عن طريق حقن 0.02 مل أو 0.02 مل من BCG أو AIF بعد ذلك تثبيط المناعة عن طريق الحقن من 0.02 مل من سيكلوسبورين (CSA). وكانت وسائل التحقيق قياس مستوى الاكتئاب اختبار Porsolt أو اختبار السباحة القسري (السباحة إجبار الاختبار) وتحديد هرمون الاستيرويد (هرمون تستوستيرون واستراديول) من خلال الأسلوب ECLIA. أظهرت نتائجنا أن ربط ليس له آثار على السباحة القسري بعد 10 و 20 يوماً بعد العملية، في حين بعد 30 أيام من يمارس تأثير مضاد للاكتئاب. العلاج BCG تأتي على مرحلتين، و *dépressogène* أو لا تشبه المرحلة المبكرة والمتأخرة مرحلة ثانية المضادة للاكتئاب مثل. وترتبط هذه الآثار مع وجود اختلافات هرمونية (هرمون تستوستيرون واستراديول). تفعيل نظام المناعة (BCG AIF) زيادة مستوى هرمون تستوستيرون ويقلل ذلك من استراديول. على العكس من ذلك، كبت المناعة (CSA) يصد هذه الآثار ويؤدي إلى انخفاض في هرمون تستوستيرون و بزيادة قدرها *oestradiol*. هناك آليات العصبية المناعة والغدد الصماء الآثار الضارة المسؤولة أو المفيدة في الكائن الحي. وإلا فإن هذه الآليات يؤدي إلى اختلال التوازن وتؤدي إلى اضطرابات المزاج.

كلمات البحث: ضمّد من الوركي، BCG، وأجبرت اختبار السباحة، التستوستيرون، استراديول¹، والاكتئاب.

ABSTRACT

Half of patients with neuropathic pain develop mood disorders such as depression and anxiety, but the mechanisms that underlie this comorbidity are not fully understood.

We opted for an experimental approach based on activation of the immune system in rats with injured sciatic nerve and explore the gonadotropic axis in order to achieve the following objectives:

- try to show that there are links between the immune system and the neuroendocrine system through measures of some neurobiological parameters (time swimming, climbing and immobility in the forced swimming test) and hormonal (testosterone and estradiol),
- attempt to explain the mechanisms involved in the onset of mood disorders in ligated animals (injury sciatica) and treated with BCG.

In our study we induced neuropathic pain associated with activation of the immune system by injection of 0.02 ml BCG or immuno-suppression by injection of 0.02 ml (20mg/kg) of Cyclosporin A (CsA).

The means of investigation have been measuring the level of depression using Porsolt swim test (Forcing Swimming Test) and assessment of steroid hormones (testosterone and estradiol) by the ELISA method.

Our results showed that ligation has no effect on the forced swimming after 10 and 20 days post-surgery, whereas after 30 days it exerts an antidepressant effect.

BCG treatment comes in two stages, an early phase depressogenic-like and late phase antidepressant-like.

These effects are associated with hormonal variations (testosterone and estradiol). Activation of the immune system (BCG) increases the testosterone level and decreases estradiol's. Conversely, immunosuppression (CsA) counteracts these effects and causes a decrease in testosterone and an increase of estradiol.

There are neuro-immune-endocrine mechanisms responsible deleterious or beneficial effects in the living organism. Otherwise, these mechanisms will result in a disruption of homeostasis and lead to mood disorders.

Keywords: Sciatic nerve injury, BCG, Forced swimming test, Testosterone, Oestradiol, Depression.

VI.1. INTRODUCTION

La moitié des patients qui souffrent de douleurs neuropathiques développent des troubles de l'humeur tels que la dépression et l'anxiété (McWilliams *et al.*, 2003; Maletic et Raison, 2009), mais les mécanismes qui sous-tendent cette comorbidité ne sont pas entièrement compris. L'accumulation des preuves suggère un rôle de la composante inflammatoire immunitaire dans l'étiologie de la dépression sous-jacente (Eyre et Baune, 2012). La dépression est un trouble de l'humeur caractérisé par des symptômes cliniques listés dans le DSM IV (Manuel Diagnostique Statistique) telle que la faible estime de soi et de la perte de plaisir ou d'intérêt lors des activités habituellement ressenties comme agréables par l'individu.

Outre les caractéristiques psychologiques, de nombreuses études ont établi une composante neurobiologique de la dépression. Ainsi, il a pu être observé une hyperactivité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA) chez des patients dépressifs (Ströhle et Holsboer, 2003). En effet, ces patients présentent une augmentation des taux plasmatiques et urinaires de cortisol, ainsi qu'une élévation marquée des concentrations de CRH (*Corticotrophin-Releasing Hormon*) dans le liquide céphalo-rachidien (Maes *et al.*, 1998; Frih *et al.*, 2009). Le cortisol étant incapable de freiner la production d'ACTH et de CRH, l'hypothèse d'un dysfonctionnement du rétrocontrôle négatif de l'axe HPA dans la dépression a été suggéré (Shelin, 2000 ; Pariante, 2003).

L'implication des monoamines dans la dépression a été également proposée après l'observation que certaines substances capables d'induire leur déplétion entraînaient le développement de symptômes dépressifs (Lemieux, 1956). De plus, la dépression serait associée à des altérations de la production cérébrale de 5-HT, NA et DA (Schildkraut, 1965 ; Lambert *et al.*, 2000). Une réduction des concentrations en NA et 5-HT a été observée dans le liquide céphalo-rachidien de patients dépressifs (Bourne *et al.*, 1968 ; Djemli *et al.*, 2015).

La relation entre le système immunitaire et la dépression a fait l'objet d'un certain nombre de travaux démontrant que la dépression était associée à une altération du fonctionnement du système immunitaire (Kronfol *et al.*, 1983; Frih *et al.*, 2013). *In vitro*, il a été montré que cette immunosuppression se caractérisait par une réduction de la prolifération des lymphocytes T et B ainsi que celle de l'activité des cellules NK (Schleifer *et al.*, 1984; Irwin et Gillin, 1987). De plus, il a pu être observé une production plasmatique accrue de cytokines inflammatoires: l'IL-1 β , l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 et l'IFN γ (Seidel *et al.*, 1995; Seidel *et al.*,

1999) , ainsi qu'une augmentation des concentrations d'IL-1 β et d'IL-6 dans le liquide céphalo-rachidien de patients souffrant de troubles dépressifs (**Levine *et al.*, 1999**). Cette forte production de cytokines étant corrélée à la sévérité des troubles de l'humeur, il a été proposé que l'activation du système immunitaire puisse être impliquée dans la pathogenèse de la dépression majeure (**Maes, 1995 ; Frih *et al.*, 2014**). De plus, l'observation qu'un tiers des patients atteints de cancers ou encore d'une hépatite C et soumis à une immunothérapie développent des troubles de l'humeur, étaye la théorie d'une relation entre cytokines et dépression (**Bonaccorso *et al.*, 2002 ; Capuron *et al.*, 2002**).

Dans certaines conditions telles qu'une infection ou lors de pathologies chroniques comprenant une composante inflammatoire, ou l'inoculation expérimentale de bactéries (lipopolysaccharides: LPS, AIF, ou encore BCG, l'activation du système immunitaire peut entraîner le développement de troubles de l'humeur (**Evans *et al.*, 2005**). Des données cliniques montrent que l'intensité des troubles de l'humeur fréquemment observés lors de l'administration thérapeutique de cytokines inflammatoires est corrélée à la diminution des taux circulants de l'acide aminé précurseur de la sérotonine, le tryptophane (Trp) (**Bonaccorso *et al.*, 2002 ; Capuron *et al.*, 2002**).

À partir de toutes ces données, nous avons opté pour une démarche expérimentale basée sur l'activation du système immunitaire chez des rats ayant subi une lésion du nerf sciatique et d'explorer l'axe gonadotrope dans le but d'atteindre les objectifs suivants:

- essayer de montrer qu'il existe des liens entre le système immunitaire et le système neuroendocrinien à travers les mesures de quelques paramètres neurobiologiques (temps de nage, immobilité et escalade dans le test de nage forcée), et hormonaux (testostéronémie et oestradiolémie),
- tenter d'en expliquer les mécanismes mis en jeu dans l'apparition des troubles de l'humeur chez les animaux ligaturés (lésion du sciatique) et traités aux BCG.

VI.2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

VI.2.1. Matériel biologique

Notre matériel biologique est le rat mâle blanc de la souche Wistar, âgé d'environ six (06) mois et de poids moyen de $250g \pm 10g$ provenant de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les animaux ont été élevés dans des cages en polyéthylène. Ils ont subi une période d'adaptation de quatre (04) semaines dans les conditions environnementales de la salle d'expérimentation (photopériode naturelle, humidité, température, etc ...). Leur nourriture était composée de maïs, d'orge, de lait et de compléments vitaminés. L'eau de boisson est servie dans des biberons *ad libitum*.

Les rats ont été 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 ont été manipulés par les mêmes expérimentateurs. Les rats ont été répartis au hasard en quatre (04) lots de huit (08) mâles par lots et on subit une batterie de tests comportementaux.

Un lot contrôle.

Un lot qui a subi une ligature du nerf sciatique (Lig)

Un lot qui a subi une ligature + BCG (Lig+BCG)

Un lot qui a subi une ligature+ BCG+cyclosporin (Lig+BCG+CsA)

VI.2.2. Ligature du nerf sciatique « *sciatic nerve injury* »

Cf. Chapitre IV.2.2

VI.2.4. Méthodes

VI.2.4.1. Application des traitements

VI.2.4.1.1. Traitements au Bacille Calmette Guérin (BCG)

Le vaccin BCG lyophilisé provient de la culture de la sous-souche Connaught du bacille Calmette Guérin, une souche atténuée du *Mycobacterium bovis* Karlson & Lessel, 1970 en suspension dans du glutamate monosodique. Les cultures de BCG sont répandues sur un milieu de croissance de Sauton, ensuite mélangées avec du glutamate monosodique lyophilisé. Les cultures du BCG sont viables après reconstitution. Le vaccin BCG est fourni en fioles multi-doses accompagnées d'un diluant composé d'une solution saline stérile tamponnée avec du phosphate contenant 0,025% de polysorbate 80. La concentration du vaccin reconstitué est de 8×10^5 à 32×10^5 unités formant des colonies (UFC) par dose pour adulte de 0,1 mL (= 0,1 mg BCG), équivalent à 4×10^5 à 16×10^5 UFC par dose pour enfant de 0,05 mL (= 0,5 mg BCG).

La dose de BCG (10^7 UFC / rat) a été sélectionnée en fonction des indications fournies par **Moreau et al. (2008)**. Le vaccin a été administré par voie intradermique (ID) dans un volume de 0.02 ml / rat. Les rats témoins n'ont reçu aucune injection.

VI.2.4.1.2. Traitement par la cyclosporine (CsA)

La cyclosporine est un agent immunosuppresseur dont l'utilisation thérapeutique, dans 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, elle est largement employée en transplantation (peau, cœur, rein, poumons, pancréas, moelle osseuse et 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 (11) acides aminés synthétisés par un champignon microscopique, le *Tolypocladium niveum* (= *inflatum*) W. Gams. Elle comporte des acides aminés dextrogyres rarement rencontrés dans la nature.

La cyclosporine a été administrée par voie intradermique (ID) dans un volume de 0,02 ml / rat et ce, après 24h de l'injection du BCG.

VI.2.5. Étude comportementale : procédure de la nage forcée (*Forced Swimming Test*)

Cf. Chapitre II.2.7.2

VI.2.6. Collecte des organes et des échantillons sanguins

Les prélèvements sanguins se font par voie rétro-orbitaire. Puis centrifugés à 5000 tours /minute. Le sérum est aliquoté jusqu'au moment du dosage hormonal de la testostérone et de l'estradiol. Les mesures ont été faites par le kit de test ELISA classique BIOTECH, avec un lecteur TECAN ELISA équipé d'un logiciel d'ordinateur Magellan qui calcule automatiquement la gamme standard et fournit la valeur de l'hormone à l'unité souhaitée directement.

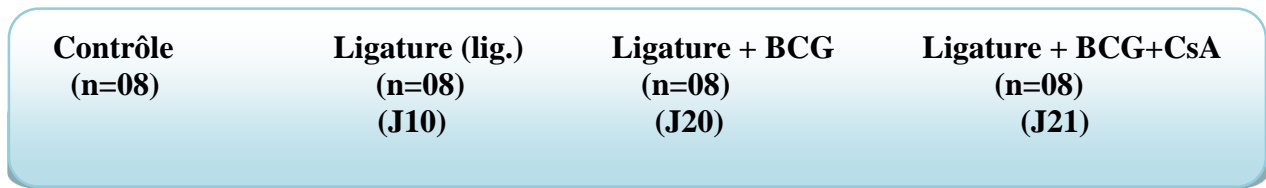
VI.2.7. Dosage de la testostéronémie et d'oestradiolémie par la méthode ECLIA

Cf. Chapitre VI.2.7

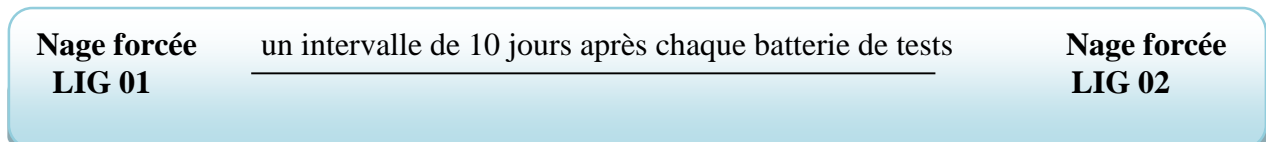
VI.2.8. Analyse statistique des résultats

Le Graph Pad Prism 5 pour Windows version 5.01 a été utilisé pour faire l'analyse statistique. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM. Elles ont été examinées par une analyse de la variance ANOVA 1 ou ANOVA 2 suivies par un *post hoc test* Newman-Keuls et Benferroni. Les résultats sont considérés comme significatifs à $p < 0,05$.

1. Lotissement des rats



2. Test de mesure de la dépression



3. Paramètre mesuré

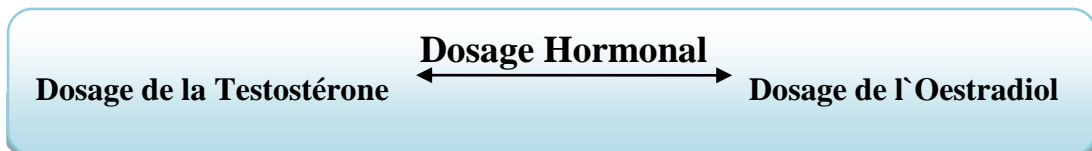


Figure VI.1: Protocole expérimental

VI.3. RÉSULTATS

VI.3.1. Résultats du traitement statistique des variations du temps d'immobilité, nage et escalade chez les rats contrôles, ligaturés et traités au BCG

Le test ANOVA1 et le test *post hoc* de comparaisons multiples de Newman-Keuls ont été utilisés (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

L'ANOVA1 pour le temps d'immobilité (C) a montré un effet significatif de ligature et de traitement ($F = 3.671$; $R^2 = 0.186$, $p < 0,0048$). Le test de Newman-Keuls a indiqué une augmentation significative du temps d'immobilité dans LIG01 vs BCG01 ($q = 5,759$, $p < 0,05$).

L'ANOVA 1 pour le temps de nage (A) a rapporté un effet significatif de la ligature et de traitement ($F = 18.16$, $R^2 = 0.531$, $p < 0,0001$). Le test de Newman-Keuls a indiqué une augmentation significative du temps de nage dans LIG01 + BCG vs LIG 01 ($q = 5.996$, $p < 0,05$).

L'ANOVA1 pour le temps d'escalade (B) a rapporté un effet significatif de la ligature et de traitement ($F = 4.114$, $R^2 = 0.189$, $p < 0,0021$). Le test de Newman-Keuls a indiqué une diminution significative du temps de montée en LIG02 vs témoin ($q = 4.776$, $p < 0,05$); LIG + BCG02 vs contrôle ($q = 3.963$, $p < 0,05$).

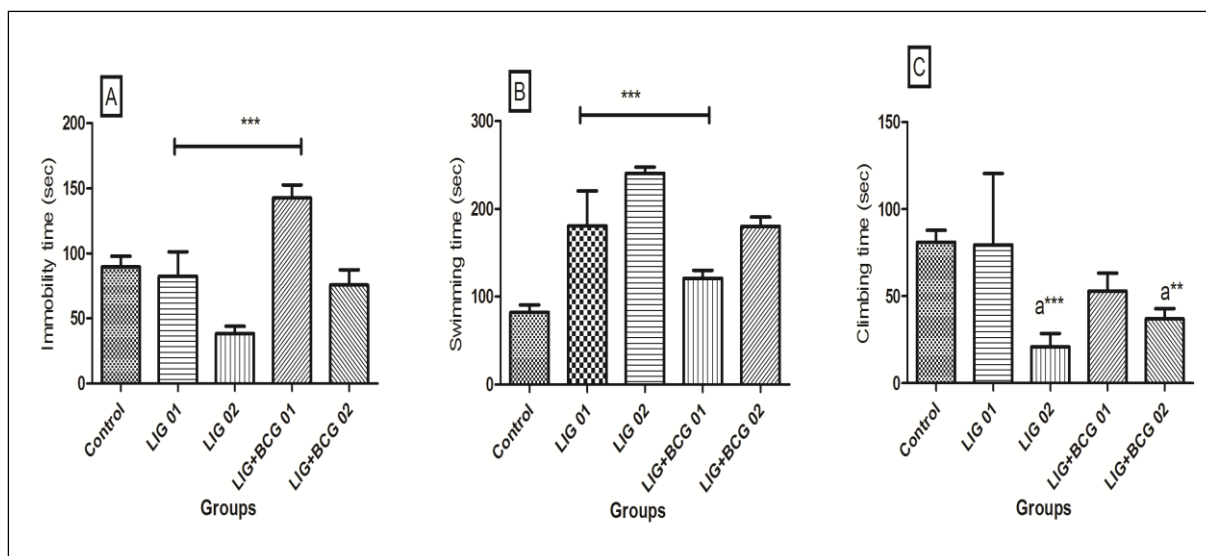


Figure VI.2 : Evolution des paramètres du test de la nage forcée: Temps d'immobilité (A) (sec), Temps de nage (sec) (B) et Temps d'escalade (sec) (C), chez le groupe contrôle et les groupes LIG et LIG + BCG (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

VI.3.4. Taux de testostérone et d'œstradiol chez les rats contrôles, ligaturés et traités

Une analyse de la variance de la testostérone a rapporté un effet significatif de ligature et de traitement ($F = 16.8$, $R^2 = 0,657$; $p < 0,0001$). Le test de Newman-Keuls a indiqué une augmentation significative des niveaux de testostérone chez **LIG LIG vs + BCG** ($q = 10.27$, $p < 0,05$); par contre il y a une diminution significative de la **LIG BCG + CsA vs LIG BCG** ($q = 6,791$, $p < 0,05$).

Une analyse de la variance pour des niveaux d'œstradiol indique un effet significatif de ligature et de traitement ($F = 26.73$; $R^2 = 0.810$, $p < 0,0001$). Le test de Newman-Keuls a indiqué une diminution significative des niveaux d'œstradiol **LIG + BCG vs contrôle** ($q = 13.20$, $p < 0,05$); **LIG + BCG + CsA vs contrôle** ($q = 8.86$, $p < 0,05$), par contre il y a une augmentation significative chez les lots: **LIG + BCG vs LIG + BCG + CsA** ($q = 4.337$, $p < 0,05$).

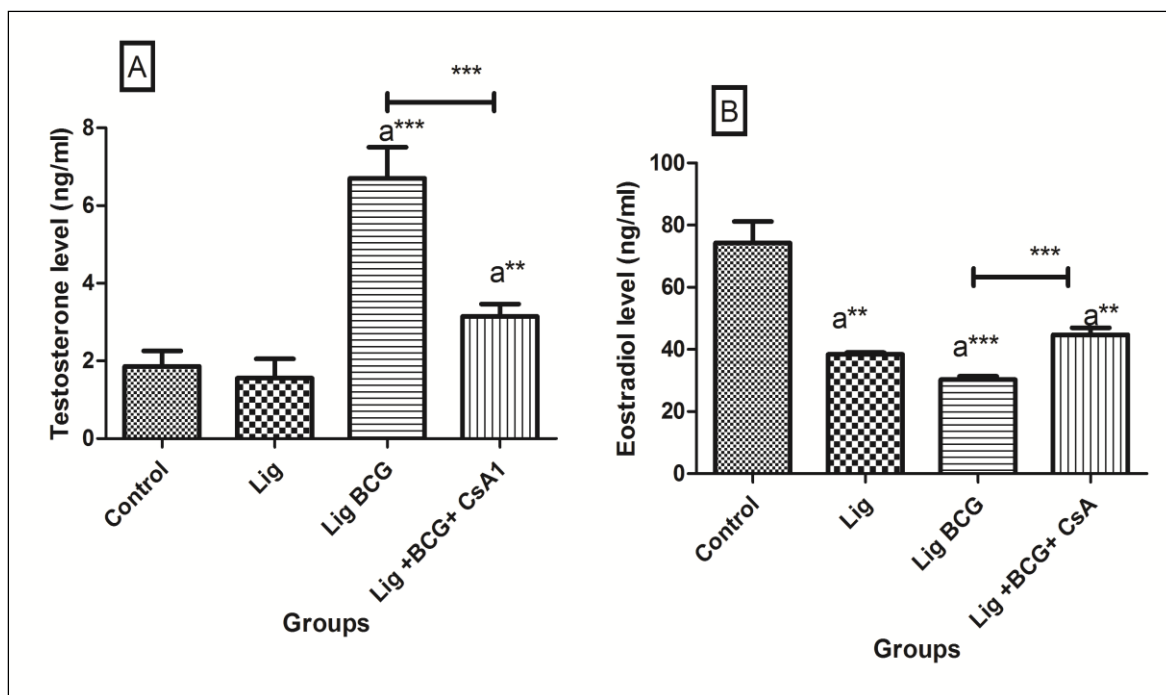


Figure VI.3: Variation des taux de testostérone (ng / ml) et d'œstradiol (ng / ml) chez le groupe contrôle et les groupes LIG LIG + BCG (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

VI.4. DISCUSSION

L'activation du système immunitaire chez des patients est associée à une augmentation de la prévalence de symptômes dépressifs (**Funkiewiez et al., 2004**). Dans la présente étude, nous avons utilisé l'inoculation du BCG afin d'induire l'activation chronique du système immunitaire.

À ce titre, nous avons analysé les effets neuropharmacologiques, au niveau du test de la nage forcée ou FST (*Forced Swimming Test*). La FST est un modèle animal de dépression qui représente une situation stressante aversive d'où le rat ne peut s'échapper, et produit une immobilité, c'est-à-dire un désespoir comportemental (**Funkiewiez et al., 2004 ; Fraia et al., 2015**). 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 car 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 considérées comme étant des antidépresseurs efficaces (**Funkiewiez et al., 2004 ; Porsolt et al., 1977**).

Dans nos résultats, concernant la FST nous avons constaté qu'au bout de 30 jours (post-ligature) la lésion du sciatique provoque un effet antidépresseur exprimé par la diminution du temps d'immobilité. L'association du BCG (stimulation immunitaire) à la douleur neuropathique (lésion du sciatique) nous montre que le BCG entraîne une évolution spatio-temporelle des paramètres de la nage forcée, avec un effet dépressinogènes-*like* au cours de la première phase (10 jours post BCG) ensuite un effet contraire antidépresseur-*like* (au bout de 20 jours post BCG). Ces constats nous démontrent clairement que le BCG agit en deux phases : une première phase précoce (délétère dépressinogènes-*like* d'après la FST) et une deuxième phase tardive (réparatrice antidépressive).

Il a été démontré que l'inoculation du BCG provoque une activation persistante d'Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygénase (IDO), enzyme responsable de la dégradation du tryptophane, au niveau périphérique et du cerveau chez les rats jusqu'à trois semaines, entraînant une diminution des niveaux de tryptophane et de ce fait de la 5HT (sérotonine) (**Moreau et al., 2005 ; Moreau et al., 2008**). Cette activation est médiée principalement par

l'interféron gamma (IFN- γ) (**Fujigaki et al., 2006**), ce qui confirme encore une fois l'évolution spatio-temporelle de la nage forcée.

Dans nos résultats (Figure VI.2), nous avons constaté que la diminution du temps d'immobilité des rats ligaturés et traités au BCG se fait en faveur d'une augmentation du temps de nage. 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 et ceux qui produisent une élévation sérotoninergique réduisent le temps d'immobilité en augmentant le temps de nage (**Funkiewiez et al., 2004 ; Fujigaki et al., 2006**).

Les hormones stéroïdes, en l'occurrence la testostérone et l'œstradiol, pourraient également être impliqués dans ces perturbations comportementales. Les résultats (Figure VI.3) montrent que le BCG entraîne une augmentation de la testostéronémie associée à une diminution des niveaux de l'œstradiol. Des tendances comparables ont été obtenues suite au traitement à l'Adjuvant Incomplet de Freund (AIF). Ce qui nous amène à penser que c'est plutôt l'immunité non spécifique qui est interpellée dans ces mécanismes neurophysiologiques entraînant la dégradation et/ou la réparation. Cette hypothèse est étayée par le fait que le traitement par un immunosuppresseur (la cyclosporine: CsA) contrecarre les effets du BCG.

Nous pouvons également signaler un problème de conversion hormonale inter-stéroïde sous l'effet de l'activation du système immunitaire où le traitement au BCG (activation du système immunitaire) provoque une augmentation de testostérone et une diminution de l'œstradiol(Figure VI.3). À l'inverse le traitement à la cyclosporine (immunosuppression SI) entraîne une diminution de la testostérone associée à une augmentation de l'œstradiol.

VI.5. CONCLUSION

Dans notre étude, nous avons essayé de démontrer qu'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 Système Nerveux Central (SNC): dopaminergique, noradrénergique, sérotoninergique et de l'axe corticotrope, telles qu'observées dans les cas de désordres psychiatriques, sont tributaires de changements au niveau des fonctions et du métabolisme des lymphocytes.

Ces changements sont très sensibles à l'expression des peptides neuroactifs tels que les neurotrophines (allo-prégnanolone), les hormones et les nombreuses cytokines, ainsi que leurs récepteurs et leurs gènes. Les similitudes dans les propriétés des récepteurs et les processus de transduction des lymphocytes et du CNS suggèrent que les lymphocytes pourraient servir d'outils de base (biomarqueurs) indispensables à la recherche sur la pathologie du SNC dans les cas de désordres psychiatriques.

Des méthodes moléculaires spécifiques à l'analyse de l'expression génique au niveau des cellules immunitaires nous permettraient d'étudier les interactions neuroimmunologiques dans les cas de désordres psychiatriques et nous fourniraient des informations utiles concernant le potentiel de ces cellules.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Les interactions et les mécanismes moteurs de la régulation entre le système nerveux centrale et le système immunitaire joue un rôle très important dans la neuro-immuno-modulation.

Dans la présente étude nous avons utilisé deux modèles de dépression animal : Le *chronique mild stress* connu depuis Willner 1977 dont on a pu confirmé sa validité à travers l'expérimentation illustrée dans le chapitre 2 et 3. Le second modèle est neuropathique qui est un model récent étudié par rapport au premier, ce modèle est détaillée dans les chapitre 4,5 et 6.

Au terme de ce travail, qui a été réalisé sur des rats soumissent à un stress chronique imprédictible (CMS) et des rats neuropathique (ligature du nerf sciatique) puis en adoptant le test de la nage forcée (FST) comme outil d'appréciation de la dépression, le test du labyrinthe en croix surélevée et le test de préférence sucrée (anhédonie) il ressort :

- L'administration de Poly E1 à long terme prévient les changements de comportement négatifs probablement causés par le stress oxydatif et exerce son effet antioxydant chez les rats CMS (Chapitre 2).
- Le traitement par le BCG agit différemment lorsqu'il est administré seul ou en association avec le CMS. L'administration du BCG seul exerce un effet dépressinogènes-*like* due à l'activation du SI. Au contraire, lorsqu'il est associé au CMS, son effet est plutôt réparateur antidépressif-*like*. (Chapitre 3).
- La ligature du nerf sciatique provoque la dépression chez le rat. La FST a également révélé une différence liée au sexe en rapport avec l'état de dépression. L'explication de cette différence réside, selon notre avis, dans la différence hormonale entre les mâles et les femelles (Chapitre 4).
- Les mâles inclus dans notre expérimentation sont susceptibles d'acquérir un comportement dépressif suite à une situation dépressinogènes provoqué par la ligature du nerf sciatique (Neuro-Inflammation) et ceci est révélé par le test de la nage forcée (Chapitre 5 et 6).
- Les sujets ligaturés ont montré une situation d'adaptation à la Neuro-Inflammation qui est justifié par la diminution de la dépression vingt jours après la ligature.
- La Neuro-Inflammation peut se prolonger dans le temps et devenir chronique.

- Nous avons constaté à travers les résultats de la nage forcée que l'administration de l'AIF et le BCG aurait un effet sur la dépression causée par la ligature du nerf sciatique (un effet réparateur au bout de 20jours) (Chapitre 5 et 6).
- Les stéroïdes sexuels ont un effet sur les fluctuations de la dépression d'où on peut conclure que la testostérone jouerait un rôle d'antidépresseur et que l'œstradiol aurait un rôle dépressinogènes (Chapitre 5et6).

A partir de ces résultats il serait intéressant de réalisée les perspectives suivantes :

- ✓ Utiliser autre model de stress exemple la suspension caudale et le stress de contention.
- ✓ Mener une étude histologique sur quelque organes (cerveau, surrénales et thymus)
- ✓ Utilises d`autre test comportementaux complémentaire. Le test aquatique de Morris et le test du champ ouvert.
- ✓ Dosage de l'interleukine IL2 et les cytokines pro inflammatoires : IL1, IL6, TNF α .
- ✓ Dosage des paramètres du stress oxydatif GST, GSH, Protéines, Catalase, Acétyle Choline estérase, MDA, NO.
- ✓ Voir les effets à long terme (sur au moins une génération) issu des mères stressées de ce type de stress (CMS ou Ligature du nerf sciatique), et voir si ces effets disparaissent par le temps ou développent d'autres maladies avec une étude thérapeutique en utilisant des plantes médicinales.

REFERENCE
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCE BIBLIOGRAPHIQUES

Abdul, M., Haque, M.H., Masanori, K.H., Yukihiko., Osamu, S. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A β 1–40 in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 19(9): 619-626.

Albert, P.R and François, B.L. (2010). Modifying 5-HT1A receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front Neurosci.*, 4:35 doi: 10.3389/fnins.2010.00035).

Ali Rachedi, B., Fraia, A., Frih, H., Zaafour, M., Guernine, S., Djemli, S.(2015). Gender differences in the Prevalence of Depression (Porsolt Swimming Test) in Sciatic Nerve Injury Model Wistar Rats. *Global Veterinaria (in press)*.

Allan ,SM and Rothwell, NJ. (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B BiolSci* 358:1669–77.

American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual for mental disorders. (DSM) . (2000). 4th Edition. Washington DC: *American Psychiatry Press, Inc.*

Andrade, S., Silveira, S.L., Arbo, B.D., Batista, B.A., Gomez, R., Barros, H.M and Ribeiro, M.F.(2010). Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.*, 99(5): 687-90(doi: 10.1016/j.physbeh.2010.02.002).

Andre, C. (2008). Etude du rôle des cytokines dans l'activation de l'indoléamine 2,3- dioxygénase cérébrale impliquée dans les altérations comportementales associées à l'inflammation. Laboratoire de Psychoneuroimmunologie, Nutrition et Génétique, Thèse de doctorat, Université Paul Sabatier (Toulouse 3), Toulouse, FRA). <http://prodinra.inra.fr/record/37456>., 285 p.

Anisman, H. (2009) Cascading effects of stressors and inflammatory immune system activation: implications for major depressive disorder. *J Psychiatry Neurosci* 34:4-20.

Antzer, R., Mormède, P.(1979). Le stress en élevage intensif. Masson, Paris ,118p.

Araque, A., Parpura, V., Sanzgiri, R.P ., Haydon, P.G. (1999). Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22:208-215.

Arzt, E., Buric, R., Stelzer, G., Stalla, J., Sauer, J., Renner, U., Stalla G.K. (1993) Interleukin involvement in anterior pituitary cell growth regulation: effects of IL-2 and IL-6. *Endocrinology* 132 (1) : 459–467.

Bae, J.M., Mun, K.C., Park, W.K., Lee, S.R., Suh, S.I., Baek, W.K. (2002). EGCG attenuates AMPA-induced intracellular calcium increase in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun*. 290:1506-12.

Baez, M., and Volosin, M. (1994).Corticosterone influences forced swimming induced immobility. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49: 729-736.

Banki, C.M., Bissette, G., Arato, M., O'Connor, L., Nemeroff, C.B. (1987).CSF

corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 144(7): 873-877.

Baumann, H., and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. *Immunol Today*, 15(2): 74-80.

Bennett, GJ and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1):87-107.

Bergeret, J., and Decourt, P. (1993). Stress et panique. Aspects psychanalytiques. *L'Encéphale*, XIX : 153-156.

Bergström, A., Jayatissa, M.N., Thykjaer, T., Wiborg, O. (2007). Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression. *J Mol Neurosci*. 33(2) :201-15.

Bernton, E.W., Meltzer, M.S., Holaday, J.W. (1988). Suppression of macrophage activation and T- lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science*, 239: 401- 404.

Berntone, W., Meltzer, M.S., Holady, J.W., Smallridge, R. C., Fein, H. G. (1987). Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science*, 238: 519-529.

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

Besedovsky, HO., Sorkin, E., Kelier, M., Muller, J. (1975). Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, 150: 466 - 470.

Beskow, J., Gottfries, C.G., Roos, B.E., Winblad, B .(1976). Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 53(1): 7-20.

Bian, Y., Pan, Z .,Hou, Z., Huang, C., Li ,W., Zhao, B. (2012) Learning, memory, and glial cell changes following recovery from chronic unpredictable stress. *Brain Res. Bull.* In press.

Bisgaard, C.F., Jayatissa, M.N., Enghild, J.J., Sánchez, C., Artemychyn, R., Wiborg, O., (2007). Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression. *J Mol Neurosci*. 32:132-44.

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

Bonaccorso, S., Marino, V., Biondi, M., Grimaldi, F., Ippoliti, F., Maes, M. (2002) . Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *Journal of Affective Disorders*, 72(3): 237-241.

Boudarene, M., Timsit-Berthier, M., Legros, J.J. (1997). Qu'est-ce que le stress ? *Rev. Med. Liège*, vol. 52, n° 8 : 541-549

Bourgeois, M. (1993). Stress, anxiété, panique. L'attaque de panique et le trouble panique. Un nouveau concept psychiatrique. *L'Encéphale*, XIX : 187-191

Bourne, H.R., Bunney, W.E. Jr., Colburn, R.W., Davis, J.M., Davis, J.N., Shaw D.M., Copen, A.J.(1968). Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, and 5-hydroxyindoleacetic acid in hindbrains of suicidal patients. *Lancet.*, 12, 2(7572):805-8.

Bowsher, D. (1980). Introduction à l'anatomie et à la physiologie du système nerveux, Medsi, Paris, 199 p.

Bratt, A.M., Kelly, S.P., Knowles, J.P., Barrett, J., Davis, K., Davis, M .(2001). Long term modulation of the HPA axis by the hippocampus behavioral, biochemical and immunological endpoints in rats exposed to chronic mild stress. *Psychoneuroendocrinol.* 26:121-45.

Bremner, J.D., Narayan, M., Anderson, E.R., Staib, L.H., Millarand, H.L., Charney, D.S. (2000). Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry.* 157:115-117.

Brochier, T., and Olié, J.P. (1993). Stress et dépression. *L'Encéphale*, XIX : 171-178.

Brown, D.H and Zwillig, B.S. (1994). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. *Journal of Neuroimmunology*, 53: 181-187.

Calvino, B., Trèves, R., Beroud, F. (2007). Douleur, inflammation et interactions système nerveux, système immunitaire. Institut upsa de la douleur. 135 p., ID Notice 253063.

Cameron, H.A and McKay, R.D .,1999 . Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat Neurosci.*2:894-7.

Capuron, L., Ravaud, A., Neveu, P.J., Miller, A.H., Maes, M., Dantzer, R. (2002). Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Molecular Psychiatry*, 7(5): 468-473.

Carlin, J.M., Borden, E.C., Byrne, G.I.(1989). Interferon-induced indoleamine 2, 3 dioxygenase activity inhibits Chlamydia psittaci replication in human macrophages. *J Interferon Res*, 9(3): 329-337.

Carrier, N. and Kabbaj, M. (2012). Testosterone and imipramine have antidepressant effects in socially isolated male but not female rats. *Horm Behav*, 61(5):678-85.

Carrier, N., Saland, S.K., Duclot, F., He, H., Mercer, R., Kabbaj, M . (2015) . The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biol Psychiatry.* 78(4) :259-69. doi: 10.1016/j.biopsych.2014.12.024. (in press).

Carrier, N., Saland, S.K., Duclot, F., He, H., Mercer, R., Kabbaj, M.(2014). The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in

Gonadectomized Male Rats. *Biological Psychiatry*, 12:024.

Cartmell, T., Luheshi, G., Rothwell, N. (1999). Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J Physiol (Lond)*, 518: 585-94.

Casarotto, P.C and Andreatini, R.(2007). Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia by chronic mild stress or dexamethasone. *Eur Neuropsychopharmacology*. 17(11):735-42.

Castex, F. (2003). Stress pathologies et immunité. Médecine-Sciences.Flammarion :pp. 45-52

Cavus, I and Duman, R.S.(2003) . Influence of estradiol, stress and 5HT_{2A} agonist treatment on brain derived neurotrophic factor expression in female rats. *Biol Psychiatry*. 54:59-69.

Choi, Y.T., Jung, C.H., Lee, S.R., Bae, J.H., Baek, W.K., Suh, M.H. (2001). The green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate attenuates beta-amyloid induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci*.70: 603-14.

Chrousos, G.P., Torpy,D.J .. Gold, P.W.(1998). Interactions between the hypothalamic pituitary adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Annals of Internal Medicine*.129 (3):229-240.

Chrousos, GP and Gold, PW.(1992).The concept of stress and stress system disorder. Overview of physical and behavioural homeostasis. *JAMA*, 267: 1244-1253.

Clarck, R.S.B., Shiding, J.K., Kaczorowski, S.L., Marion, D.W., Kochanek, P.M.(1994). Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: accumulation of weight drop and controlled cortical impact model. *J Neurotrauma*, 5: 499-506.

Cocke ,R., Moynihan ,J.A., Cohen ,N., Grotta, L. J., Ader, R.(1993). Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune responses in BALB/c mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 7: 36-46.

Contreras, C.M., Martínez-Mota, L., Saavedra, M. (1998). Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 22(7): 1121-8.

Coppen, A. (1967). The biochemistry of affective disorders. *British Journal of Psychiatry*, 113: 1237-1264.

Craft, RM., Mogil, J.S., Aloisi, A.M. (2004). Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur J Pain*, 8(5): 397–411.

Crocq, L. (1992). Le syndrome de répétition dans les névroses traumatiques. Ses variations cliniques, sa signification. *Perspective Psychiater*, 31-32 : 59-65.

Crocq, L., Sliham, M., Brarrois, C. (1982). Névroses traumatiques (névroses d'effroi, névroses de guerre). *Encycl. Med . Chir (Paris-France). Psychiatry.*, 37 : 309-314.

Dagyte, G., Crescentea, I., Postemaa, F., Seguind, L., Gabriel , C., Mocaerd, E.,

Den, B., Johan, A., Koolhaas, J.M. (2011). Agomelatine reverses the decrease in hippocampal cell survival induced by chronic mild stress. *Behavioral Brain Research* 218:121–128.

Dantzer, R., O'Connor, J.C., Freund, G.G., Johnson, R.W., Kelley, K.W. (2008). From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9(1): 46-56.

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

Dellarole, A., Morton, P., Brambilla, B., Walters, W., Summers, S., Bernardes, D., Grilli, M., Bethea, J.R. (2014). Neuropathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling. *Brain, Behavior, and Immunity*. 41: 65–81.

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.

Dhabhar, F.S and McEwen, B.S. (1998). Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 840: 359-372.

Diane, A. (2006) Stress, axe corticotrope et caractéristiques nutritionnelles et métaboliques. Thèse de Doctorat Sciences. INA. Paris Grignon France.

Djemli, S., Ali Rachedi, B., Frih, H., Fisson, S. (2015). The Beneficial Effect of Zinc on Nickel-Induced Oxidative Stress Liver Injury in Rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 7 (1): 26-33.

DSM-IV. (1994). Diagnostic and statistical manual of mental disorders. 4th ed. Washington, DC: *American Psychiatric Association*.

Dunn, A., Wang, J., Ando, T. (1999). Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv Exp Med Biol*, 461: 117-27.

Echeverry, S., Shi, X.Q., Zhang, J. (2008). Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain*, 135:37- 47.

Eddleston, M. and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54:15-36.

Elder, G.A., De Gasperi, R., Gama Sosa, M.A. (2006). Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. *Mt Sinai J Med*. 73:931-40.

Elizalde, N., Gil-Beafj Ramirez, M.J., Aisa, B., Lasheras, B., Del Rio, J., Tordera, R.M. (2008) Long-lasting behavioral effects and recognition memory deficit induced by chronic mild stress in mice: effect of antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 199:1-14.

Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., López-Rubalcava, C. (2004).

Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, 173:139-45.

Estrada-Camarena, E., Fernández-Guasti, A., López-Rubalcava, C. (2006). Participation of the 5-HT_{1A} receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 31: 247-55.

Evans, D.L., Charney, D.S., Lewis, L., Golden, R.N., Gorman, J.M., Krishnan, K.R., Nemeroff, C.B., Bremner, J.D., Carney, R.M., Coyne, J.C., Delong, M.R., Frasare-Smith, N., Glassman, A.H., Gold, P.W., Grant, I., Gwyther, L., Ironson, G., Johnson, R.L., Kanner, A.M., Katon, W.J., Kaufmann, P.G., Keefe, F.J., Ketter, T., Laughren, T.P., Leserman, J., Lyketsos, C.G., McDonald, W.M., McEwen, B.S., Miller, A.H., Musselman, D., O'Connor, C., Petitto, J.M., Pollock, B.G., Robinson R.G., Roose, S.P., Rowland, J., Sheline, Y., Sheps, D.S., Simon, G., Spiegel, D., Stunkard, A., Sunderland, T., Tibbits, P. Jr., Valvo, W.J. (2005). Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*, 58(3): 175-189.

Exton, MS. (1997) Infection-induced anorexia: active host defence strategy. *Appetite* 29 (3):369–83.

Eyre, H and Baune, B.T. (2012). Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (9), 1397-1416.

Fava, G.A., Sonino, N., Morphy, M.A. (1987). Major depression associated with endocrine disease. *Psychiatr Dev.* 5(4):321-48.

Ferreira, S.H., Lorenzetti, B.B., Bristow, A.F., Poole, S.(1988). Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334:698-700.

Filomeni, G and Ciriolo, M.R. (2006). Redox control of apoptosis: an update. *Antioxid Redox Signal.* 8(11-12):2187-92.

Filova, B., Malinova, M., Bavckova, J., Toyhova, L., Ostatnikova, D., Celec, P., Hodosy, J. (2015). Effects of testosterone and estradiol on anxiety and depressive-like behavior via a non-genomic pathway. *Neurosci Bull* (in press).

Fraia, A., Ali Rachedi, B., Zouiche, S., Djemli, S., Frih, H. (2015). Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats. *Global Veterinaria*, 4 (4): 478-489.

Frih, H., Bensaci, L., Djenidi, R., Ali Rachedi, B., Tahraoui, A. Fisson S. (2013). Freund's Complete Adjuvant (FCA) Could Reverse the Depressive-Like Symptoms Induced by Chronic Mild Stress (CMS) in Mice. *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 4:143. doi: 10.4172/2155-9562.1000143.

Frih, H., Chettoum, A., Guedri, K., Frih, N., Ali Rachedi, B., Djenidi, R., Fisson, S. (2014). Risk Factors of Mood Disorders (Depression and Anxiety) in Smoking Subjects: Reliability with the Age of Smoking Initiation and Inflammatory Processes. *Annual Research & Review in Biology*, 4(12): 1988-2006.

Frih, H., Djenidi, R., Ali Rachedi, B., Frih, N., Tahraoui, A., Bairi, M. (2010). [Ketoconazole antagonizes the immune and gonadotropic systems in the forced swimming test in male Wistar rats]. [Article in French] Le kétoconazole antagonise les effets immunogonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(7): 733-744.

Frih, H., Latreche, A., Ali Rachedi, B., Djenidi, R., Sahraoui, L., Tahraoui, A. (2012). Evolution of Elevated Plus Maze Test (Anxiety) and Porsolt Swimming Test Depression) Parameters in Wistar Female Rats Treated with Low Dose of Toluene from the 4th to 14th day of Pregnancy: Implication of Progesterone to Protect GABAergic route. *Journal of Depression and Anxiety*, 1:110. doi: 10.4172/2167-1044.1000110.

Frih, H., Sahraoui, L., Frih, N., Toumi, L., Bairi, M., Tahraoui, A., Maurel, D., 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 dexaméthasone (0,5 mg). *Évolution Psychiatrique de Paris*, 74 (4): 581-591.

Frye, C.A and Walf, A.A. (2009). Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. *Physiol Behav*, 97:266-269.

Frye, C.A. and Walf, A.A. (2002). Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav*, 41(3): 306-15.

Fujigaki, Y., Goto, T., Sakakima, M., Fukasawa, H., Miyaji, T., Yamamoto, T. (2006). Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21:41-50.

Funkiewiez, A., Ardouin, C., Caputo, E., Krack, P., Fraix, V., Klinger, H., Chabardes, S., Foote, K., Benabid, A., Pollak, P. (2004). Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood, and behaviour in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 75(6): 834-839.

Galinowski, A. (1993). Stress et panique. Aspects immunologiques. *L'Encéphale*, XIX : 147-157

Garcia-Bonacho, M., Esquifino, A.I., Castrill, P., Reyes, Toso., C.D.P., Cardinali. (2000). Age-dependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats. *Life Sciences* 66(20): 1969-1977.

Garcia-Diaz, E.C., Gomez-Quiroz, L.E., Arenas-Rios, E., Aragon-Martinez, A., Ibarra-Arris, J.A., Retana-Marquez, M.D. (2015). Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. *Syst Biol Reprod Med*. 2:1-11.

Gary, W.E and Pilyoung, K. (2013). Childhood Poverty, Chronic Stress, Self-Regulation, and Coping. *Child Development Perspectives*, 7(1): 43-48.

Gau, Q., Zhao, B., Li, M., Shen, S., Xin, W. (1996). Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim Biophys Acta*. 1304: 210-22.

Gillies, G.E., Linton, E.A., Lowry, P.J. (1982). Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, 299: 355-357.

Gomes, K.S., Nunes-De-Souza, R.L. (2009) Implication of the 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} (but not 5HT_{1A}) receptors located within the periaqueductalgray in the elevated plus-maze test–retest paradigm in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 33: 1261–1269

Gonfloni, S., Maiani, E., Di Bartolomeo, C. Diederich, M., Cesareni, G. (2012). Oxidative Stress, DNA Damage, and c-Abl Signaling: At the Crossroad in Neurodegenerative Diseases? *International Journal of Cell Biology*, Article ID 683097, 7 p.

Guillemin, G.J., Smythe, G., Takikawa, O., Brew, B.J. (2005). Expression of indoleamine 2, 3 dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*, 49(1): 15-23.

Hallenbeck, JM. (2002) The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8:1363–8.

Haour, F., Jafarian-Tehrani, M., Gabellec, MM., Crumeyrolle-Arias, M., Hu, Y., Wick, G., Ternynck, T. (1998). Interleukin-1 receptor defect in autoimmune NZB mouse brain. *Ann N Y Acad Sci*, 1; 840:755-61. Review.

Haque, A.M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., Shido, O. (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J Nutr*.136:1043-7.

Hart, B.L. (1988) Biological basis of the behavior of sick animals. *Neurosci Biobehav Rev* 12 (2):123–37.

Hayashi, M., Mistunaga, F., Ohira, K., Shimizu, K. (2001). Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res*. 918:191-6.

Hinz, B and Hirschelmann, R. (2000). Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm. Res.*, 17: 1273-1277.

Hirokawa, K., Sato, K., Makinodan, T. (1982). Influence of age of thymic grafts on the differentiation of T cells in nude mice. *Clin Immunol Immunopathol* 24(2) : 251–262.

Holmes, J.E. and Miller, N.E. (1963). Effects of bacterial endotoxin on water intake, food intake, and body temperature in the albino rat. *J Exp Med* 118:649–58.

Holsboer, F. (1999). Clinical neuroendocrinology. In: D Charney, E Nestler. B Bunney. *Neurobiology of mental illness. Oxford University Press*, 149-161.

Holsboer, F. (1999). Neuroendocrine studies and antidepressant drug development.

Seishin Shinkeigaku Zasshi, 101: 711-716.

Houdeau, E., Moriez, R., Leveque, M., Salvador-Cartier, C., Waget, A., Leng, L., Bueno, L., Bucala, R., Fioramonti, J.(2007). Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, 132(3): 982-993.

Ibi, M., Matsuno, K., Shiba, D., Katsuyama, M., Iwata, K., Kakehi, T., Nakagawa, T., Sango, K., Shirai, Y., Yokoyama, T., Kaneko, S., Saito, N., Yabe-Nishimura, C. (2008). Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J Neurosci*, 28(38): 9486-9494.

Irwin, M and Gillin, J.C. (1987). Impaired natural killer cell activity among depressed patients. *Psychiatry Research*, 20: 181-182.

Ishiyama N Kitagawa M Takahashi H Kina T Hirokawa K (1998) Expression of VCAM-1 in lymphocytes during the process of apoptosis. *Pathobiology* 66 : 274–283.

Karant S Lyson McCann SM (1993) Role of nitricoxide in interleukin 2-induced corticotropin-releasing factor release from incubated hypothalami. *ProcNatlAcadSciU.S.A.*90(8) : 3383–3387.

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

Kelley ,KW.,Bluthé, RM.,Dantzer,R., Zhou ,JH.,Shen, WH ,Johnson ,RW.(2003) Cytokine induced sickness behavior. *Brain BehavImmun*17(Suppl 1):S112–8.

Kensil, C.R., Mo, A.X., Truneh, A. (2004). Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Front Biosci.*, 9: 2972-2988.

Khan, N., Afaq, F., Saleem, M., Ahmad, N., Mukhtar, H. (2006) . Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Research*. 66: 25002505.

Kim, D., You, B., Jo, E.K., Han, S.K., Simon, M.I., Lee, S.J.(2010). NADPH oxidase 2- derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury induced neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33): 14851-14856.

Koch, A., Zacharowski, K., Boehm, O., Stevens, M. Lipfert, P., Von Giesen, H.J., Wolf, A., Freynhagen, R.(2007). Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflamm. Res.* 56(1):32-7.

Kohri, T., Matsumoto, N., Yamakawa, M., Suzuki, M., Nanjo, F., Hara, Y. (2001) . Metabolic fate of (–)-[4-3H] epigallocatechin gallate in rats after oral administration. *J Agric Food Chem.* 49:4102-12.

Kronfol, Z., Silva, J.R., Greden, J., Dembinski, S., Gardner, R., Carroll ,B. (1983). Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sciences*. 33: 241-247.

Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., Maes, M. (2011). In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 35: 744-759.

Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., Maes, M. (2011) In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35: 744–759.

Kubzansky, L.D., Kawachi, I. (2000). Going to the heart of the matter: do negative emotions cause coronary heart disease? *J. Psychosom. Res.*, 48(4-5): 323-37.

Kuner, R. (2010). Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med.*, 16(11): 1258-66, doi: 10.1038/nm.2231.

Kuriyama, S., Hozawa, A., Ohmori, K., Shimazu, T., Matsuiand, T., Ebihara, S. (2006) . Green tea consumption and cognitive function: a crosssectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am J Clin Nutr*. 83:355-361.

Lambert, G., Johansson, M., Agren, H., Friberg, P. (2000). Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Archives of General Psychiatry*, 57(8): 787-793.

Lee, S., Suhand, S., Kim, S. (2000). Protective effects of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett*. 287:191-4.

Lee, S.R., Im, K.J., Suh, S.I., Jung, J.G. (2003). Protective effect of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother Res*. 17: 206-9.

Lemieux, G., Davignon, A., Genest, J. (1956). Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Canadian Medical Association Journal*, 74(7): 522-526.

Leung, L and Cahill, C.M. (2010). TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *J. neuroinflammation*, 7:27.

Levine, J., Barak, Y., Chengappa, K.N., Rapoport, A., Rebey, M., Barak, V. (1999). Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*, 40(4): 171-176.

Li, S., Wang, C., Wang, W., Dong, H., Hou, P., Tang, Y. (2008) Chronic mild stress impairs cognition in mice: from brain homeostasis to behavior. *Life Sci* 82:934–42.

Lucas, SM., Rothwell, NJ., Gibson, RM. (2006) The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147:S232–40.

Maes, M. (1995). Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19(1):

11-38.

Maes, M. (1999). Major depression and activation of the inflammatory response system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461: 25-46.

Maes, M. (2008) The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression. *NeuroEndocrinolLett* 29:287–91.

Maes, M., Lin, A., Bonaccorso, S., van Hunsel, F., Van Gastel, A., Delmeire, L., Biondi, M., Bosmans, E., Kenis, G., Scharpé, S. (1998). Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 98: 328-335.

Maes, M., Smith, R., Scharpe, S. (1995) The monocyte-T-lymphocyte hypothesis of major depression. *Psychoneuroendocrinology* 20:111–6.

Maier, S.F., Wiertelak, E.P., Martin, D., Watkins, L.R. (1993) Interleukin-1 mediates the behavioural hyperalgesia produced by lithium chloride and endotoxin. *Brain Res* 623(2): 321–4.

Maletic, V and Raison, C.L. (2009). Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in Bioscience* (Landmark Ed.), 1(14):5291-5338.

Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S.B. (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6(7): 521-532.

Marchetti, L., Klein, M., Schlett, K., Pfizenmaier, K., Eisel, U. (2004) Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway. *J Biol Chem* 279:32869–81.

Marfak, A. (2003). Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp. 24-42.

Martínez-Mota, L., Cruz Martínez, J., Márquez-Baltazar, M., Fernández-Guasti, A. (2008). Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 88(3): 332-40.

Martínez-Mota, L., Ulloa, R.E., Herrera-Pérez, J., Chavira, R., Fernández-Guasti, A. (2011). Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiology & Behavior*, 104: 900-905.

Marx, C., Ehrhart-Bornstein, M., Scherbaum, W., Bornstein, S. (1998). Regulation of adrenocortical function by cytokines-relevance for immune-endocrine interaction. *Horm. Metab. Res.*, 30(6-7):416-20.

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

McGeer, P.L., Rogers, J.(1992). Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*. 42(2): 447-449.

McMahon, S.B., Cafferty, W.B., Marchand, F. (2005). Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp Neurol*, 192:444-462.

McWilliams, L.A., Cox, B.J., Enns, M.W. (2003). Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain*, 106: 127-133.

M'Dahoma, S. (2013). Spinal cord transection and intrathecal injection of BDNF : two relevant models of neuropathic pain in rats. Human health and pathology. Université René Descartes- Paris, 211 p.

Mekaouche, M., Siaud, P., Givalois, L., Barbanel, G., Malaval, F., Maurel, D., Assenmacher, I., Ixart, G. (1996). Different responses of plasma ACTH and corticosterone and of plasma interleukin 1 beta to single and recurrent endotoxin challenges. *J Leukoc Biol.*, Mar; 59:341-346.

Miller, A.H. (2010) Depression and immunity: A role for T cells? *Brain Behavior and Immunity* 24:1–8.

Miller, A.H., Maletic, V., Raison, CL. (2009) Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. *Biol Psychiatry* 65:732–41.

Mineur, Y.S., Belzung, C., Crusio, W.E. (2007) Functional implications of decreases in neurogenesis following chronic mild stress in mice. *Neuroscience* 150(2):251–9.

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

Moalem, G. and Tracey, D.J. (2006). Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.*, 51(2):240-264.

Moalem, G., Xu, K., Yu, L.(2004). T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, 129(3):767-777.

Mollace, V., Nottet, H.S.L.M., Clayette, P., Turco, M.C., Carolina-Muscoli, C., Salvemini, D., Perno, C.F. (2001) Oxidative stress and neuroAIDS: triggers, modulators and novel antioxidants. *Trends Neurosci* 24:411-416.

Montgomery, K.C. (1955).The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol.* 48: 254-260.

Moreau M., Lestage J., Verrier D., Mormede C., Kelley K.W., Dantzer R. and Castanon N. (2005). Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 192(3): 537-544.

Moreau, M., André, C., O'Connor, J.C., Dumich, S.A., Woods, J.A., Kelley, K.W., Dantzer, R., Lestage J., Castanon, N. (2008). Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to

mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(7): 1087-1095.

Munck, A. and Guyre, P.M. (1991) Glucocorticoids and immune function. In : R Ader, DL Felten, N Cohen. *Psychoneuroimmunology*. New York, Academic Press., 447-474.

Munck, A. (2000). Mucoviscidose : inflammation, stress oxydant, infection. Essais de manipulation nutritionnelle [Cystic fibrosis: nutritional therapy against inflammation, oxidative stress, and infection]. *Nutr. Clin. et Métabo*. 14(3): 201-205.

Munhoz, C., Madrigal, JL., García-Bueno, B., Pradillo, J.M., Moro, M.A., Lizasoain, I. (2004) TNF α accounts for short-term persistence of oxidative status in rat brain after two weeks of repeated stress. *Eur J Neurosci* 20:1125–30.

Naik, A.K., Tandan, S.K., Dudhgaonkar, S.P., Jadhav, S., Kataria, H., Prakash, M. V.R. Kumar, D. (2006). Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain*, 10(7): 573-579.

Nakagawa, K. and Miyazawa, T. (1997). Absorption and distribution of tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J Nutr Sci Vitaminol*. 43: 679-84.

Nemeroff, C.B. (1988).The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. *Pharmacopsychiatry*.21:76-82.

Neumann, I.D., Wigger, A., Liebsch, G.,Holsboer ,F., Landgraf, R. (1998). Increased basal activity of the hypothalamo–pituitary–adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 449-463.

Nic Dhonnchadha, B.A., Bourin, M., Hascoët, M. (2003). Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res*. 140:203-214.

Oguzhanoglu, N.K., Sozeri-Varma, G., Karadag, F., Tumkaya, S., Efe, M., Kiroglu, Y. (2014). Prefrontal cortex neurochemical metabolite levels in major depression and the effects of treatment: an HMRS study. *Turk Psikiyatri Derg*. 25(2):75-83.

Oprea, A and Kress, M.(2000). Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor- α , IL-1 β , and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J. Neurosci*, 20(16):6289-6293.

Parent, A.J., Beaudet, N., Beaudry, H., Bergeron, J., Bérubé, P., Drolet, G., Sarret, P., Gendron, L. (2012) Increased anxiety-like behaviors in rats experiencing chronic inflammatory pain. *Behavioural Brain Research* 229 : 160– 167.

Pariante, C.M. (2003). Depression, stress and the adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*,15: 811-812.

Pariante, C. and Miller, A.H. (2001). Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*. 49(5): 391-404.

Patterson, P.H. (2011). Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med.* 17(7): 389-39.

Pintana, H., Chattipakom, N., Chattipakom, S. (2015). Testosterone deficiency, insulin-resistant obesity and cognitive function. *Metab Brain Dis.* (in press).

Pomerantz, R.J.(2004) Effects of HIV-1 Vpr on neuro invasion and neuro pathogenesis. *DNA Cell Biol* 23:227-238

Porreca, F., Ossipov, M.H., Gebhart, G.F. (2002). Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.* 25(6):319-25.

Porsolt, R.D., Anton, G., Blavet, N., Jalfre, M.(1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47(4): 379-91.

Porsolt, R.D., Bertin, A.G., Blavet, N., Deniel, M., 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.

Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M. (1977). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie*, 229(2): 327-336.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M. (1977). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604): 730-732.

Power, C., Gill, M.J., Johnson, R.T. (2002) Progress in Clinical Neurosciences : The Neuro pathogenesis of HIV Infection: Host-Virus Interaction and the Impact of Therapy. *Can J NeurolSci* 29: 19-32.

Prunt, L., Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors : a review *Eur J Pharmacol* 163:3-33.

Qin, L., Wu, X., Block, M.L., Liu, Y., Breese, G.R., Hong, J.S. (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55(5):453-62.

Rabin, D., Gold, P.W., 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.

Ramer, M.S., Bradbury, E.J., McMahon, S.B.(2001). Nerve growth factor induces P2X₃ expression in sensory neurons. *J. Neurochem*, 77(3):864-875.

Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L. (2000). Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur. J. Pain*, 4(3):247-257.

Rice-Evans, C.A. (1999). Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants *in vitro* for chemoprevention in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 220:262-6.

Rivier, C and Vale, W. (1983). Interaction of corticotropin-releasing factor and

arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion *in vivo*. *Endocrinology*. 113: 939-942.

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

Rubin, R.T., Mandell, A.J., Crandall, P.H.(1966). Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites. *Science*. 153(3737): 767-8.

Rupprecht, R.(2003). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2): 139-168.

Sapolsky, R., Rivier, C., Yamamoto, G., Plotsky, P., Vale, W. (1987). Interleukin 1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotrophin releasing factor. *Science.*, 238: 522-524.

Sapolsky, R.M., Krey, LC ., MCEwen, BS. (1986). The neuroendocrinology of stress and aging : the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Re.*, 7: 284-301.

Sapolsky, RM., Romero, L.M., Munck, A.U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21 (1): 55-89.

Schatzberg, A.F, Rothschild, A.J., Langlais, P.J., Bird, E.D., Cole, J.O.(1985). A corticoste- roid/dopamine hypothesis for psychotic depression and related states. *J Psychiatr Res.* 19(1): 57-42.

Schildkraut J.J., Gordon E.K., Durell, J. (1965). Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *Journal of Psychiatric Research*, 3: 213-228.

Schildkraut, J.J. (1965). The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry*. 122 (5): 509-22.

Schleifer, S.J., Keller, S.E., Meyerson, A.T., Raskin, M.J., Davis, K.L., Stein, M. (1984). Lymphocyte function in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*. 41: 484-486.

Seidel, A., Arolt, V., Hunstiger, M., Rink, L., Behnisch, A.,Kirchner, H.(1995). Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology*, 41(6): 534-538.

Seidel, A., Rothermundt, M., Rink, L. (1999). Cytokine production in depressed patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461: 47-57.

Selye, H. (1956).Le stress de la vie. *Paris, Gallimard.*,432 pages.

Selye, H. (1974). Stress without distress. *Psychopathology of Human Adaptation*. *New York, New York American Library*. pp 137-146.

Sheline, Y.I. (2000). 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major

depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biological Psychiatry*, 48(8): 791-800.

Shores, M.M., Sloan, K.L., Matsumoto, A.M., Mocerri, V.M., Felker, B., Kivlahan, D.R. (2004). Increased incidence of diagnosed depressive illness in hypogonadal older men. *Arch Gen Psychiatry*. 61:162-7.

Singh, M and O'Hagan, D. (1999). Advances in vaccine adjuvants. *Nature Biotechnology*. 17: 1075-1081.

Singh, M. (2007). *Vaccine adjuvants and delivery systems*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 449.

Skurlova, M., Stofkova, A., Jurcovicova, J. (2011) Anxiety-like behavior in the elevated-plus maze tests and enhanced IL-1, IL-6, NADPH oxidase-1, and iNOS mRNAs in the hippocampus during early stage of adjuvant arthritis in rats. *Neuroscience Letters* 487: 250–254.

Smith, R.G., Betancourt, L., Yuxiang, S. (2005). Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev*. 26:203-50.

Smith, R.S. (1991). The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*. 35(4): 298-306.

Sommer, C. and Kress, M. (2004). Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361:184-187.

Song, C. (2002) The effect of thymectomy and IL-1 on memory: Implications for the relationship between immunity and depression. *Brain Behavior and Immunity* 16 :557–568.

Stites, D.P., Bugbee, S., Siiteri, P.K. (1983). Differential actions of progesterone and cortisol on lymphocyte and monocyte interaction during lymphocyte activation-relevance to immunosuppression in pregnancy. *J. Reprod. Immunol*, 5 : 215-220.

Stocco, C. (2008). Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*. 73(5):473-87.

Ströhle, A and Holsboer, F. (2003). Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry*, 36 Suppl. 3: S207-214.

Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Itoand, H., Fujiki, H. (1998) . Wide distribution of [³H](–)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis*. 19:1771-6.

Sung, B., Lim, G., Mao, J. (2003). Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J. Neurosci*, 23:2899-2910.

Tanabe, M., Nagatani, Y., Saitoh, K., Takasu, K., Ono, H. (2009). Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling

in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*, 56(3): 702-708.

Tanapat, P., Hastings, N.B., Reeves, A.J., Gould, E. (1999). Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*.19 :5792-801.

Thomas-Antérion, C., Truche, A.(1998). Stress, anxiété et mémoire. *La Revue de Gériatrie*, Tome 23, n° 8 : 723-728

Thurin, J.M.(1996). Une vie sans soi. Clinique et interprétation des maladies psychosomatiques. *Frison Roche*, 237 p.

Todd , K.G. and Butterworth , R.F. (1999) Early microglial response in experimental thiamine deficiency: an immunohistochemical analysis. *Glia* 25:190-198.

Uceyler, N and Sommer, C. (2008). Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett*, 437:194-198.

Uceyler, N., Rogausch, J.P., Toyka, K.V., Sommer, C. (2007). Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, 69(1):42-9.

Ueda, H. (2008). Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol Pain*, 4:11.

Unno, T and Takeo, T. (1995) . Absorption of (-)epigallocatechin gallate into the circulation system of rats. *Biosci Biotechno Biochem*. 59: 1558-9.

Van Praag, H.M. (2004). Can stress cause depression? *Progress in Neuro-Pharmacology and Biological Psychiatry*. 28(5): 891-907.

Vargas, G.A and Arnett, P.A. (2013). Attributional style and depression in multiple sclerosis: the learned helplessness model. *Int J MS are*. 15(2): 81-9.

Veiga, S., García-Segura, L.M., Azcoitia, I. (2004). The neuroprotective properties of sex steroids and neurosteroids. *Rev Neurol*. 39:1043-51.

Veldhuis, H.D., De Korte, C.C., De Kloet, E.R. (1985) . Glucocorticoids facilitate the retention of acquired immobility during forced swimming. *Eur. J. Pharmacol*. 115 (2-3): 211-7.

Verdu, E.F., Deng, Y., Bercik ,P., Collins, S.M.(2002). Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 283(1): G27-36.

Vitkovic, L., Bockaert, J ., Jacque, C.(2000). Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain? *J. Neurochem*, 74(2): 457-71.

Vitor, R.F., Mota-Filipe, H., Teixeira, G. (2004). Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J. Ethnopharmacol*. 93 (2-3): 363- 370.

Vitoriano-Souza, J., Das Dores Moreira, N., Teixeira-Carvalho, A., Martins Carneiro, C., Siqueira, F.A.M., de Abreu Vieira, P.M., Giunchetti, R.C., de Lima Moura, S.M., Fujiwara, R.T., Melo, M.N., Reis, A.B. (2012). Cell Recruitment and Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freund's Adjuvant, and Monophosphoryl Lipid A. Immune Response in Skin Sensitized with Adjuvants. 7(7): e40745.

Vollmayr, B., Mahlstedt, M.M., Henn, F.A. (2007). Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 257:300-3.

Wallace, D.R. (2006) HIV neurotoxicity: potential therapeutic interventions. *J Biomed Biotechnol* 1-10

Williams, M.A., Turchan, J., Lu, Y., Nath, A., Drachman, D.B. (2005) Protection of human cerebral neurons from neurodegenerative insults by gene delivery of soluble tumor necrosis factor p75 receptor. *Exp Brain Res* 165:383–91.

Willner, P. (1997) Validity: Reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: A 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology (Berl)* 134:319-329.

Willner, P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology.*134:319–29.

Willner, P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural–neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology.*52:90-110.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S., Muscat, R. (1987) Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology (Berl)* 93:358-364.

Winkelstein, BA., Rutkowski, MD., Sweitzer, SM., Pahl, JL., DeLeo, JA. (2001). Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J. Comp. Neurol.*, 439(2):127-139.

Wollman, I. (2010) Rôle de l'audition dans la perception de l'espace. Thèse de doctorat. Paris. France. pp139.

Woolf, C.J. (2010). What is this thing called pain? *J. Clin. Invest.*, 120:3742-3744.

Yeh, TH., Lee, Y., Gianino, da SM., Gutmann, D.H. (2009). Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)-regulated glial proliferation. *Glia*, 57:1239-1249.

Yesavage, J.A., Davidson, J., Widrow, L., Berger, P.A. (1985). Plasma testosterone levels, depression, sexuality, and age. *Biol Psychiatry.* 20: 222-5.

Yirmiya, R. (1996) Endotoxin produces a depressive-like episode in rats. *Brain Res* 711(1–2): 163–74.

You, Z., Luo, C., Zhang, W., Chena, Y., Heb, J., Zhao, Q., Rui, Z., Wua, Y. (2011)

Pro- and anti-inflammatory cytokines expression in rat's brain and spleen exposed to chronic mild stress: Involvement in depression. *Behavioral Brain Research* 225:135– 141.

Yun, T.K., Lee, Y.S., Lee, Y.H., Kim, S.I., Yun, H.Y. (2001). Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C. A. Meyer and identification of active compounds. *J Korean Med Sci.* 16:6– 8.

Zaafour, M., Fraia, A., Frih, H., Guernine, S., Djemli, S., Ali Rachedi, B. (2015). Assessment of steroids changes (testosterone and oestradiol) after BCG inoculation in sciatic nerve injury model (male Wistar rat). *Global Veterinaria (in press)* 14(6) : 805-812.

Zhang, M., Zheng, H., Yamasaki, T., Kohashi. (2001). The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats. *Immunology.* 98(2): 267-272.

Zorrilla, EP., Luborsky, L., McKay, Jr., Rosenthal, R., Houldin, A., Tax, A., McCorkle, R., Seligman, DA., Schmidt, K.(2001). The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav. Immun.*, 15(3): 199-226.

Zunszain, PA., Anacker, C., Annamaria, C., Carvalho, L.A., Pariante, C.M. (2011). Glucocorticoids, cytokines and brain abnormalities in depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 35: 722–729.

Zuo, Y., Perkins, N.M., Tracey, D.J., Geczy, C.L.(2003). Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, 105(3):467-479.

Publications

Publication I

**Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused
by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats**

Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats

Asma Fraia, Bachir Alirachedi, Sabrina Zouiche, Samir Djemli and Hacène Frih

Departement of Biologie, Faculty of Sciences, Université Badji Mokhtar,
Bp12 El Hadjar, Annaba 23000, Algeria

Abstract: The aim of the present study is to examine behavioral and hormonal changes in chronic mild stress (CMS) depression model in male Wistar rats and evaluate the possible effects of Polyphenon E (PolyE) therapy. CMS (for 40 days) was applied; Poly E (5g/"L" or 10g/"L") was administered during CMS. To evaluate behavioral changes, forced swimming test (depression) and plus maze test (anxiety) parameters were calculated. The sucrose intake test and food intake was also evaluated. At the end of the experiment plasma testosterone and relative organs weight (brain, adrenal and testes) were assessed. The CMS decreases testosterone levels, increases relative adrenal weight and generated in animals depressogenic-like, anxiogenic-like behavior and the loss of sucrose and food intake. Contrary, the administration of Poly E1 (5g/"L") to CMS group seems to reverse adrenal weight and testosterone levels and causes antidepressive-like and anxiolytic-like behavior. Polyphenon E could improve negative changes caused by CMS.

Key words: CMS • Polyphenon E • Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) • Behavior • Depression

INTRODUCTION

It has been well established that chronic stress is crucially related to the pathophysiology of mood disorders [1]. Major depression is a mood disorder characterized by clinical symptoms listed in DSM IV such as anhedonia (an incapacity to experience pleasure) [2], neurochemical changes [3] and endocrine disease [4, 5]. Two of the most important hormonal changes related to depression are a reduction in testosterone (T) levels and a stress-dependent sustained increase of plasmatic glucocorticoids, due to an impaired negative feedback in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis (HPA) [6,7].

Among the complex interplay of multitudinous pathophysiological factors of depression, oxidative stress has been reported to play a key role. The theory of oxidative stress in depression can be explained by the concept that excessive amount of free radicals are toxic to the neuronal cells and can affect the physiological activity of the brain [8]. The accumulated reactive oxygen species are highly unstable in nature and have potential to damage cellular proteins, lipids and nucleic acids [8]. The endogenous antioxidant enzymes have free radical scavenging action [8]. However, enhanced accumulation

of free radicals due to increased production and/or deficiencies of antioxidant defense results in oxidative stress in the brain that culminate in the development of psychological deficits such as depression [9].

In experimental psychiatry, animal models are an important tool to study neuropsychological theories of specific disorders, such as depression [10]. Accordingly, an animal model has been developed by Willner *et al.* [10] using Chronic mild stress (CMS) in rodents to mimic the pathophysiological changes associated with stressful events that can invoke depression-like behavior. The paradigm (CMS) consists of several mild stressors which are analogous to those associated with humans. In this paradigm, animals are subjected to a variety of mild stressors every day. After several weeks, the animals show a decrease in consumption of a palatable sweet solution, known as anhedonia, which is the core character of depression [10].

Antioxidants are molecules which can interact with free radicals and break the chain reaction before vital molecules are damaged. It has been suggested that fruits and vegetables may play an important role in delaying the onset of some illnesses, such as certain cancers, cardiovascular diseases and degenerative diseases and

about the possible therapeutic value of antioxidants against these illnesses [11]. To date, over 3000 flavonoids have been identified. These can mainly be found in the pigments in flowers or in leaves [12]. Flavonoids are primarily known for their anti-oxidative, vasculoprotective [13], anti-inflammatory and antidiabetic properties. Green tea contains a considerable amount of polyphenolic compounds and green tea polyphenols have aroused increasing attentions in recent years for protecting brain's functions. Green tea contains multiple catechin components, though epigallocatechin-3-gallate is the primary catechin accounting for 50–80% in a brewed cup [14]. Epicatechin-3-gallate is the second most concentrated catechin component of green tea and is associated with its antiinflammatory/antioxidant properties [11]. Other major catechins found in green tea include epicatechin and epigallocatechin. Polyphenon E (PolyE) is a well defined pharmaceutical grade mixture of polyphenols that contain at least five different catechins: epicatechin, galocatechin gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), with EGCG being the most abundant [15].

The aim of the present study is to examine behavioral and hormonal changes in CMS depression model in Wistar male rats and evaluate the possible effects of Polyphenon therapy.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals: Adult male Wistar rats (purchased from Pasteur Institute, Algiers) weighing between 200 and 300 g were used. The rats were housed in polypropylene cages with wood shavings as bedding, under controlled room conditions of light (12 "h" light–dark cycle, lights on at 07:00 am) and temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), with free access to food and water. Animals were softly handled 3 to 5 minutes per day by the experimenter before the onset of the experiment.

After an acclimatization period of 15 days, 32 male rats were divided into 4 groups: a control group non stressed animals ($n=8$), a group of 8 rats submitted to chronic mild stress (CMS) for 6 weeks, a group of 8 rats chronically stressed and treated with Poly E1 ($5\text{g}/\text{L}$) (CMS+PolyE1) and group of CMS+PolyE2 ($10\text{g}/\text{L}$) ($n=8$). Poly.E was administered for 40 days at a constant volume $5\text{g}/\text{L}$ (Poly E1) and $10\text{g}/\text{L}$ (Poly E2) except prior to the sucrose preference test or when they were submitted to chronic mild stress. The experimental protocol of CMS was shown in Table 1.

Table 1: Program of stressors and duration applied every day

Days	Stress factors	Duration
1	Water deprivation	24 h
2	Food deprivation	24 h
3,4,5	Isolation	24 h
6	Flashing light	3 h
7	Food deprivation	24 h
8	Forced swimming	10 min
9	Wet litter	1 h
10	Water deprivation	24 h
11, 12	No stress	-
13	Wet litter 4°C	2 h
14	Flashing light	2 h 1/2
15	Food deprivation	24 h
16	Forced swimming	15 min
17, 18, 19	Isolation	24 h
20	Water deprivation	24 h
21	Food deprivation	24 h
22	Flashing light	3 h
23	Wet litter	1 h
24, 25	Isolation	24 h
26	Wet litter 4°C	1 h 1/2
27	Forced swimming	10 min
28	Flashing light	3 h 1/2
29	No stress	-
30	Food deprivation	24 h
31	Wet litter	1 h
32	Flashing light	2 h
33	Water deprivation	24 h
34	Wet litter 4°C	2 h
35	Forced swimming	10 min
36, 37	Isolation	24 h
38	Water deprivation	-
39	Flashing light	3 h
40	Forced swimming	10 min

The depression-related behaviours were assessed before (baseline) and after the CMS procedure by the elevated plus-maze (EPM) and Forced swimming test (FST). The experimental protocol was approved by the Scientific Committee of our faculty which is consistent with the principles of Animal Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1985).

Food Intake: The standard food in the form of diets especially for rats (Oravi el Harrouch, Skikda Algeria) is supplied to the animals. The food intake was performed in the rat's home cage. Pre-weighted bottle containing food was presented to each rat. The bottle was weighted again after 8h and the weight difference was calculated. The food intake was realized in days 3, 8, 16, 22 and 31.

Sucrose Preference Test: All the rats were submitted to 48 h of forced exposure to 1% sucrose solution in order to habituate to it, during which sucrose solution was the only fluid available for consumption, followed by two days of free access to food and water. After this, the rats were submitted to water deprivation for 16 "h" prior to performing the sucrose preference test; baseline test at day zero. The sucrose preference test was realized in days 0, 11, 21, 34 and 39. The sucrose preference test [16] was performed in the rat's home cage: two pre-weighted bottles, one containing tap water and another containing 1% sucrose solution, were presented to each rat. The bottles were weighed again after 1 "h" and the weight difference was considered to be the rat intake from each bottle. The sum of water and sucrose intake was defined as total intake and the sucrose preference was expressed as the percentage of sucrose intake from the total intake following the formula: % sucrose preference= sucrose intake X100/total intake.

Chronic Mild Stress: Chronic mild stress (CMS) was used according to the literature [17]. The 3 groups CMS, CMS+PolyE1, CMS+PolyE2 were submitted to 40 days of chronic mild stress. Several stressors have been used: food deprivation, water deprivation, forced swimming, flashing light, isolation, wet litter and wet litter at 4°C. The stress was applied at times that change every day, in order to minimize its predictability. Control rats were kept intact in their cages for 40 days, receiving only usual care, food and water.

Polyphenon E Administration: PolyE is a well defined pharmaceutical grade mixture of polyphenols that contain at least five different catechins: epicatechin, gallic acid gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), with EGCG being the most abundant [15]. In this study, stressed animals were exposed to both PolyE1 (5g/"L" in water) and Poly E2 (10 g/"L"). Polyphenon E was obtained from Tokyo Food Techno (Tokyo, Japan).

Body Weight Gain: Body weights were measured weekly during the CMS procedure. The body weight gain was calculated as the difference between the final and baseline (day 0) body weight.

Behavioral Study

Elevated plus Maze Test: The elevated plus maze test [18] is used to measure the degree of anxiety in rodents. It is composed of four arms (50 × 10cm), two open arms

perpendicular to two closed arms with 40cm high walls of Plexiglas. The intersection of the four arms (central area) is a square of 10 × 10cm. The apparatus was elevated of 50cm from the ground. The test was performed for 5 min by placing the animal in the central area facing an open arm. Since the rat fears the empty and high spaces, his exploration of open arms shows a less anxious behavior. On the contrary, the more the animal remains in the closed arms, his behavior are known to be anxious. The 5 min sequences were recorded by a video camera to measure the following parameters: Open arms duration, closed arms duration, Open arms entries, closed arms entries and Freezing duration.

Forced Swimming Test: The forced swim test [19] is a behavioral test of inducing despair in rats by placing the animal 15min in a glass aquarium 54 cm height (34 × 60cm). This dimension ensures that the rat can't escape by climbing to the edges of the device. The aquarium is filled with water (26 °C) to a height of 40 cm, in order to ensure that the rat will not use his legs to keep the surface and thus force him to swim. The procedure of forced swimming (FST) in rats occurs in two phases: the pre-test and test, separated by an interval of 24 hours. During the pre-test, the rat was placed for 15 min. At the end of session, the animal is immobile. The next day, the animal plunged into the aquarium for 5 min. The swimming session on each day was videotaped for behavioral analysis. The time of immobility, swimming and climbing are calculated.

Blood Sample and Organs Collection: Retro-orbital blood samples were collected. Blood samples were centrifuged at 5000 r/min to be used for hormone assays of testosterone, which measured these levels by the BIOTECH conventional ELISA test kit, with a TECAN ELISA reader equipped with Magellan computer software that automatically calculates the standard range and provides the value of the hormone to the desired unit directly. The rats were killed under slight ether anesthesia at the end of the experiment. The testes, adrenal glands and brain were removed, cleared of adhering connective tissue and weighed.

Statistical Analysis of Results: Data are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA or two-way ANOVA and Newman and Keuls or Benferroni as the post hoc test. Results were considered significant at $p < 0.05$. Graph Pad Prism 5 for windows version 5.01 was used to do the analysis.

RESULTS

Effect of CMS and CMS+Poly E on the Depressive-Like Behavior: One-way ANOVA was conducted to compare the effect of CMS and CMS+ Poly E on immobility, climbing and swimming times in the FST. Benferroni multiple comparison test was used to compare groups to another.

There was a significant effect on immobility time Benferroni test indicates that CMS induced a depressive-like behavior evident as a significant increase in immobility time in the FST (Control vs CMS: $t = 3.404$, $p < 0.05$). Treatment of stressed rats by poly E produces antidepressant-like behavior effect explained by the reduction of immobility time (Control vs CMS+Poly E1: $t = 9.844$, $p < 0.0001$); (Control vs CMS+Poly E2: $t = 5.674$, $p < 0.0001$); (CMS vs CMS+Poly E1: $t = 13.25$, $p < 0.0001$); (CMS vs CMS+Poly E2: $t = 9.078$, $p < 0.0001$).

We also see that there was a significant effect on climbing time (R squared = 0.8958, $F = 80.23$, $p < 0.0001$). Benferroni test indicates that CMS induced a significant decrease in climbing time in stressed animals compared to Control group (Control vs CMS: $t = 3.826$, $p < 0.001$). Climbing time increases in CMS+Poly E1 group compared to Control and CMS groups (Control vs CMS+Poly E1: $t = 7.835$, $p < 0.0001$); (Control vs CMS+Poly E2: $t = 9.475$, $p < 0.0001$); (CMS vs CMS+Poly E1: $t = 11.66$, $p < 0.0001$); (CMS vs CMS+Poly E2: $t = 13.30$, $p < 0.0001$). Finally, there was a significant effect on swimming time (R squared = 0.8207, $F = 42.73$, $p < 0.001$). Benferroni test indicates that CMS+Poly E induced a significant increase in swimming time compared to stressed animals (CMS vs CMS+Poly E1: $t = 10.55$, $p < 0.0001$); (CMS vs CMS+Poly E2: $t = 4.134$, $p < 0.001$).

Anxiety-Like Behavioral Effects of CMS and CMS+Poly E in the Elevated Plus-Maze Test: One-way ANOVA was used to compare different groups. Benferroni multiple comparison test was used to compare groups to another.

The analyse of time spent in open arms revealed a significant effect of treatments (R squared = 0.9276, $F = 119.7$, $p < 0.0001$). Treatment (CMS and Poly E) also has an effect on the number of entries in the open arms ($R^2 = 0.8362$, $F = 47.65$, $p < 0.0001$) and the immobility time ($R^2 = 0.9413$, $F = 149.7$, $p < 0.0001$).

Stressed rats spent less time in the closed arms and there come less often. This demonstrates that the CMS leads to an increase of anxiety in animals. CMS decreased motor activity as evidenced by significantly higher time of immobility. Conversely Poly E, regardless of the dose, resulting in an increase of locomotion.

Temporal Evolution of the Weight Changes (Gram) Measured in CMS and CMS+Poly E: Two-way ANOVA test indicates that the treatment has no effect ($F = 1.752$, $p = 0.1995$), by against, the days factor has an effect ($F = 18.17$, $p < 0.0001$). CMS induced a marked body weight at the end of the experiment (day 50). This decrease is not statistically significant.

Temporal Evolution of Food Intake (G/100g of Body Weight) in CMS and Poly E groups: Two-way ANOVA indicated a significant difference on the food intake (Control vs CMS) in days (D03, D08) ($p < 0.001$) (D22, D31) ($p < 0.001$) but no significance difference D16. (Control vs CMS+Poly E1) we notice significant difference in days (D0, D03, D08, D16) ($p < 0.001$) and in the D22 we have significance difference ($p < 0.05$). In the last day D31 no significance difference. About the group (Control vs CMS+Poly E2) we note a significance difference in days (D0, D03, D08) ($p < 0.001$), D16 no significance difference, days (D22, D31) significance difference ($P < 0.001$). the group (CMS vs CMS+Poly E1) presents a significance difference in days (D0, D03, D08, D16, D22) ($p < 0.001$), (CMS vs CMS+Poly E2) days (D0, D03, D08) a significance difference ($p < 0.001$), days (D16, D22) no significance difference ($p > 0.05$), D31 a significance difference ($p < 0.001$). Finally the lasts groups (CMS+Poly E1 vs CMS+Poly E2) a significance difference ($p < 0.001$) all days of treatment (D0, D03, D08, D16, D22, D31).

Temporal Evolution of Sucrose Intake (%) in CMS and Poly E groups: Two-way ANOVA indicated a significant effect of treatment ($F = 342.1$, $p < 0.0001$), Days ($F = 353.3$, $p < 0.0001$) and interaction ($F = 177.8$, $p < 0.0001$). Benferroni post-tests was used to compare each column (treatments) to all the others columns. The test revealed a significant differences between Control vs (CMS, CMS+Poly E1 and CMS+Poly E2) on day 00, day 21 and day 34. No significant seen between Control and CMS+Poly E1 on day 39.

Effects of CMS and CMS+Poly E in Testosterone Levels: CMS significantly decreased relative testosterone levels ($F = 21.95$, R squared=0.7016, CMS vs control: $q = 10.32$, $p < 0.0001$). This decrease is reversed by Poly E1 treatment (CMS+Poly E1 vs control: $q = 2.846$, NS).

Effects of CMS and CMS+Poly E in Organ Weights: According to Newman-Keuls multiple comparison Test method there is significant difference in group (Control vs CMS) ($p < 0.05$) but (Control vs CMS+Poly E2) no significant difference is found regarding the (CMS + Poly E2 vs CMS) we notice a significant difference ($p < 0.05$).

Table 2: Bonferroni's Multiple Comparison Test. Evolution of the weight changes (gram) measured in CMS and CMS+Poly E. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

Days	D0	D10	D20	D30	D40	D50
Control vs CMS (t, p value)	0	1.19	1.432	2.42	0.963	0.765
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
Control vs CMS+Poly E1 (t, p value)	0	0.07409	1.432	1.408	1.467	0.829
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
Control vs CMS+Poly E2 (t, P value)	0	0.5927	0.07409	1.605	0.321	2.233
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
CMS vs CMS+Poly E1 (t, P value)	0	1.264	0	1.013	0.5038	0.064
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
CMS vs CMS+Poly E2 (t, P value)	0	0.5976	1.506	0.815	0.6421	1.467
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns
CMS+Poly E1 vs CMS+Poly E2 (t, P value)	0	0.6668	1.506	0.1976	1.146	1.403
	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
	ns	Ns	ns	ns	ns	ns

Table 3: Bonferroni's Multiple Comparison Test. Sucrose intake (%) in CMS and Poly E groups (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

Days	00	11	21	34	39
Control vs CMS (t, p)	3.036	1.14	22.58	11.17	23.47
	*	ns	***	***	***
Control vs CMS+Poly E1 (t, p)	4.416	1.14	25.72	30.82	1.74
	***	ns	***	***	ns
Control vs CMS+ Poly E2 (t, p)	3.195	1.486	0.052	5.457	19.65
	**	ns	ns	***	***
CMS vs CMS+Poly E1 (t, p)	1.38	0	3.135	19.66	21.73
	Ns	ns	*	***	***
CMS vs CMS+ Poly E2 (t, p)	0.1588	0.345	22.64	5.708	3.812
	Ns	ns	***	***	**
CMS+Poly E1 vs CMS+ Poly E2 (t, p)	1.221	0.345	25.77	25.37	17.91
	Ns	ns	***	***	***

Finally (CMS+Poly E2 vs CMS +Poly E1) and (CMS + Poly E1 vs CMS) we have not significant difference. (Control vs CMS) significant difference ($p < 0.05$), (Control vs CMS+Poly E1, Control vs CMS+Poly E2) no significant difference, (CMS+Poly E2 vs CMS) significant difference ($p < 0.05$), (CMS+Poly E2 vs CMS+Poly E1, CMS+Poly E1 vs CMS).

DISCUSSION

The CMS model has been extensively used by many researchers, their results have shown that rodents exposed to chronic stress reduce their sucrose intake after some weeks [17]. Our results confirm this observation when chronic stress for 40 days generated in animals depressogenic-like and anxiogenic-like behavior effects manifested by the reduction of immobility time (in the forced swimming test), decreasing of locomotion,

time spent and number of entries in the open arms (in the plus maze test) and the loss of sucrose intake (in preference sucrose test) called anhedonia behavior. These changes indicated depression-like changes in CMS rats and demonstrated the feasibility of the depression model.

These behavioral findings are corroborated with other weight and hormonal parameters, in this case, plasma T levels and the relative weights of the adrenals, brain and testes. The chronic mild stress caused a significant increase of adrenal weight accompanied by reduction of T rate. Contrary, the administration of Poly E1 at a dose (5g/L) to CMS group seems to reverse adrenal weight and T levels and causes antidepressive-like and anxiolytic-like behavior.

Increasing attention is being paid in recent years to explain the origin of the decline of T in stressed animals. The mechanism by which is affected has not yet been

clarified. Stress is associated with detrimental effects on male reproductive function. It is known that stress increases reactive oxygen species generation in the male reproductive tract [20]. In this study, it was shown that chronic cold stress causes a decrease in testicular absolute weight, associated increasing of reactive oxygen species and lipid peroxidation production at 20, 40 and 50 days. The activity of superoxide dismutase and glutathione peroxidase decreased throughout the duration of chronic stress and the activity of catalase decreased at 40 and 50 days and increased at 20 days. The expression of copper/zinc superoxide dismutase and catalase were not modified, but the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase decreased at 20 days. These results suggest that during acute chronic cold stress equilibrium redox is lost, with low enzyme activity but without modifying their expression. In addition, corticosterone increased while T decreased [20].

Psychological stress activated HPA which resulted in the increasing release of glucocorticoids. Many studies inferred that endogenous glucocorticoids played an important role in the pathological impairments induced by stress [21]. For a long time, it was recognized that the T reduction could be associated with a dysfunction of the adrenal HPA axis. Indeed, the gonadotropic axis is inhibited by all the various levels components of the HPA axis [7,22, 23]. The hypothalamus, CRH (corticotropin releasing hormone) inhibits GnRH (gonadotropin releasing hormone) hypothalamic in arcuate nucleus. This effect could be also mediated by β -endorphin from the split of proopiomelanocortin (POMC) under the effect of hypothalamic CRH [24]. In addition, glucocorticoids exert inhibitory effects on hypothalamic GnRH neuron and the gonads in causing decreased sensitivity of target tissues to sex steroids (Peripheral resistance) [22].

In this study, we examined the neuropharmacological effects of Poly E in the Forced swimming test (FST). There FST is an animal model of depression, is a aversive stressful situation where rats cannot escape and produces immobility [19]. During the FST, rats show active behavior (swimming and climbing), as well as passive (immobility). The molecules which decrease the duration of immobility in the FST are considered as effective antidepressants [19]. In our study, we found that Poly E1 (5g/"L") decreases immobility time. This indicates an antidepressant-like effect of these drugs. However, this decrease in immobility time can be either in favor of an increase in swimming time. Theoretically this explains why Poly E1 exerts its anti depressive-like effect by acting on the serotonergic route [7,25]. The plus Maze test is one

of the more behavior models popular for anxiety. Increasing the number of entries and the time spent in the open arms are considered the most indexes representative of anxiolytic-like activity. In this device, the rats prefer normally spend much of their time in the closed arms. This behavior seems to reflect an aversion to the open arms which is generated by the fear of open spaces. Drugs that increasing exploration of open arms is considered anxiolytics and the reverse is true for anxiety [26]. At the maze test, we found that the Poly E1 exercises anxiolytic-like effect.

These behavioral effects can have several origins. Either the Poly E1 could act directly by changing the oxidative status, or that its effects are mediated by corticosterone and/or T. As such, several studies showed that T plays an important role in brain dysfunction associated with stress. Firstly, T levels are positively correlated with cognitive impairment [27]. Moreover, it appears that T exerted beneficial effects in brain function, including preventing neuronal cell death, balancing brain oxidative stress and antioxidant activity, improving synaptic plasticity and involving cognitive formation [27]. Due to its lipophilic nature, T readily crosses the blood brain barrier and acts directly in the brain by genomic pathway. Indeed in a very recent study by Filová *et al.* [28], it was shown, among gonadectomized rats that T has a non rapid effect compared to estradiol which appears to have a rapid effect mediated by a non-genomic pathway. In another study, it was reported that both T and estradiol exhibit anxiolytic- and antidepressant-like effects in gonadectomized male rats, while similarly regulating critical mediators of these behaviors, suggesting common underlying mechanisms [29]. In this study, it is suggested that T's protective effects are mediated, in part, by its aromatization in the dentate gyrus [29].

It's has been shown that during the forced swimming, corticosteroid hormones regulate the immobility time [30, 31] noted an increase in corticosterone accompanied by an increase of immobility time in forced swimming test. Surgical adrenalectomy results in decreased immobility time [30, 32, 33]. However, the administration of corticosterone (1 mg /kg) the first day of test after 15 minutes (first FST), increases the second immobility time test day (2nd FST). Dexamethasone (dose-dependent) abolished this effect [30, 33]. The metyrapone (120 mg /Kg) (blocks 11 β -hydroxylase) injected 3 hours before the first FST reduced significantly the immobility time. This effect is donated by the corticosterone (dose-dependent).

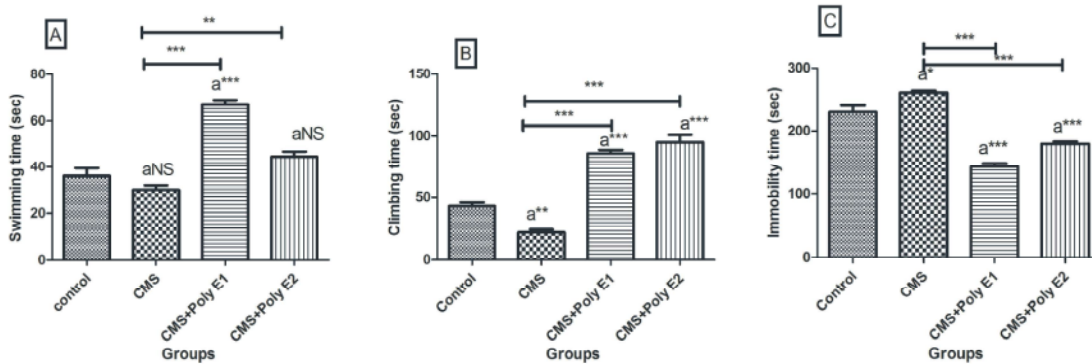


Fig. 1: Effect of CMS and CMS+Poly E on the depressive-like behavior (A: Swimming time, B: Climbing time, C: Immobility time). One-way ANOVA and Benferroni multiple comparison test post hoc test were used to compare groups to another (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

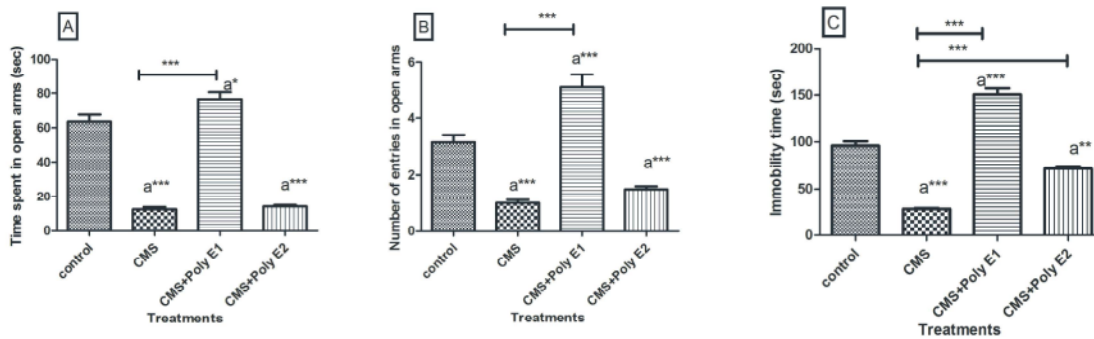


Fig. 2: Anxiety-like behavioral effects of CMS and CMS+Poly E in the elevated plus-maze test (A: Time spent in open arms ("s"), B: Number of entries in open arms, C: Immobility time ("s")). One-way ANOVA was used to compare different groups followed with Benferroni multiple comparison test to compare groups to another (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

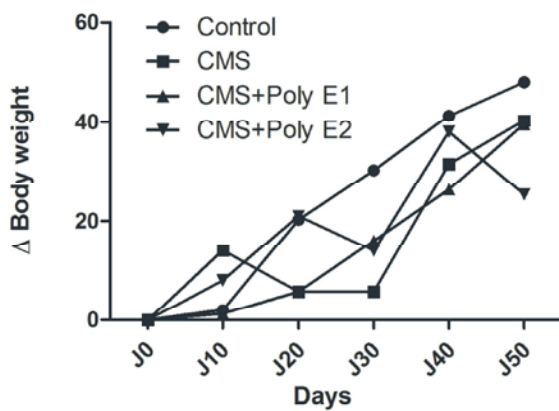


Fig. 3: Temporal evolution of the weight changes (gram) measured in CMS and CMS+Poly E. Two-way ANOVA test treatment X Days and Benferroni post-tests were used to compare each column (treatments) to all the others columns (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

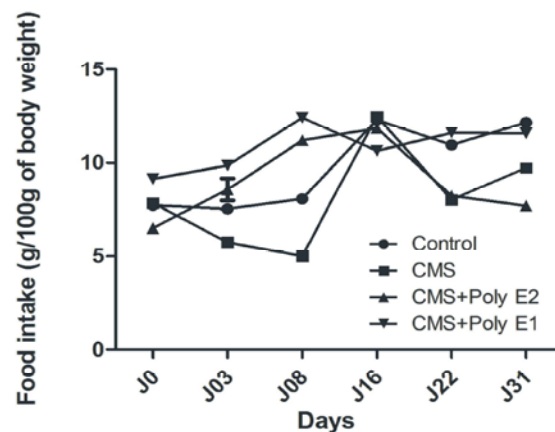


Fig. 4: Effects of CMS and Poly E on the food intake (g/100g of body weight) measured in CMS and CMS+Poly E. Two-way ANOVA test treatment X Days and Benferroni post-tests were used to compare each column (treatments) to all the others columns (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

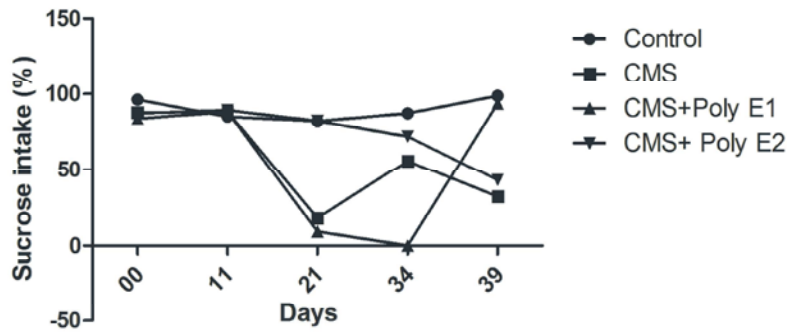


Fig. 5: Temporal evolution of sucrose intake (%) in CMS and Poly E groups. Two-way ANOVA treatment X Days. Benferroni post-tests was used to compare each column (treatments) to all the others columns. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

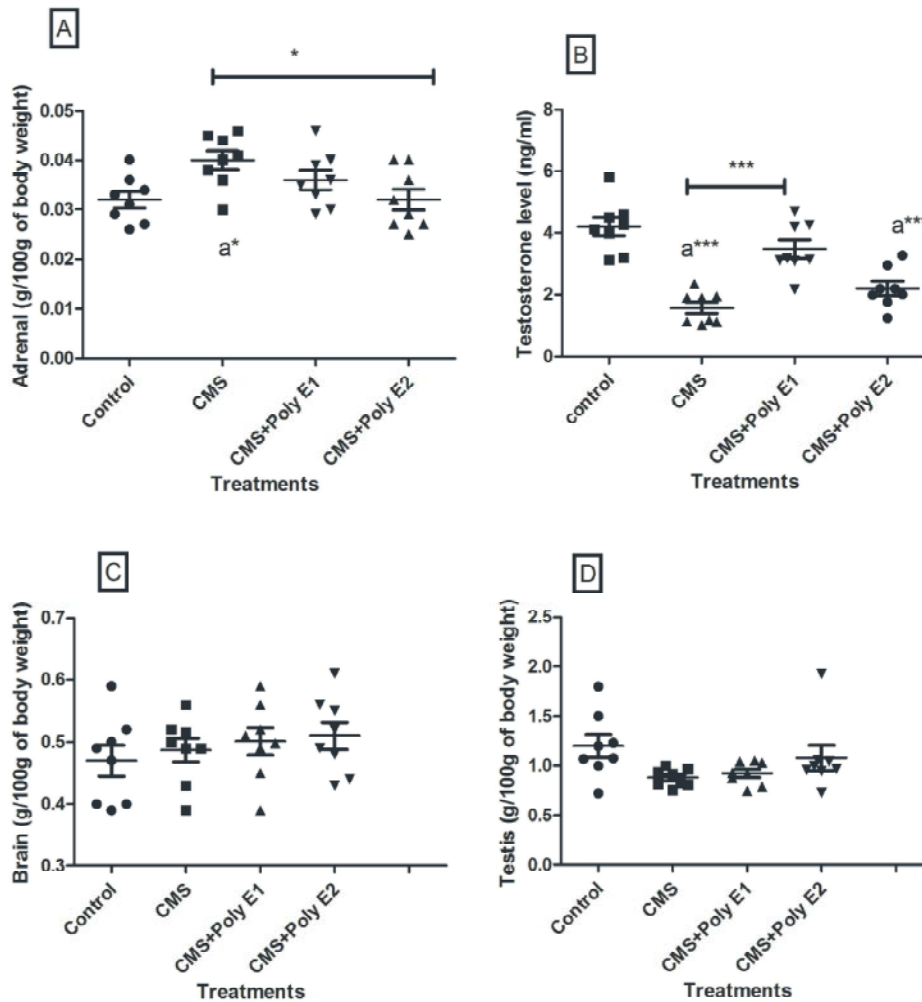


Fig. 6: Effects of CMS and CMS+Poly E in organs weights (g/100g of body weight)(A: Adrenal, C: Brain, D: Testes) and testosterone level (ng/ml)(B). One-way ANOVA and Newman-Keuls multiple comparison post hoc test were used (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

There is experimental evidence showing that gonadal hormones steroids T and estradiol have neuroprotective effects [34]. For example, these steroids inhibit stress-induced neurodegeneration, primarily in the hippocampus [35, 36], a brain structure involved in the etiology of depression [37]. It has been suggested that depression is associated with the reduction in hippocampal cell neurogenesis [36]; thus, the higher capacity of stressed rats to develop anhedonia could be explained by plastic changes in the brain. Indeed, recent research indicate that resilience to CMS is associated to the expression of alpha and beta SNAP proteins in the hippocampus and to the expression of genes involved in hippocampal signaling [39], suggesting that the development of anhedonia after exposure to CMS is related to an impairment of hippocampal neurogenesis or cellular plasticity pathways [38, 39].

In old animals, the brain alterations that lead to a higher capacity to develop experimental depression could be underlain by age-related low levels of T and estradiol; which impair biological processes related to neuroplasticity and neuroprotection [40]. In this line, some studies have shown an age-dependent decreased production of neurotrophic factors such as BDNF [41], which in turn is modulated by estradiol [42] and an age-dependent reduction in hippocampal neurogenesis, effectively restored by adrenalectomy. Furthermore, it has been observed that estradiol stimulates hippocampal neurogenesis [44]. In line with this idea, there are many clinical studies showing that low T levels are associated to an increased capacity to develop depression [45,46]. Although most of these studies consider hypogonadal patients, the results support the idea that there is an inverse relationship between T levels and depression. As we have pointed out above, that polyphenon E (PolyE) contains at least five different catechins: epicatechin, gallic acid, gallic acid gallate, epigallocatechin, epicatechin gallate and epigallocatechin-3-gallate (EGCG), with EGCG being the most abundant [15]. EGCG acts as an antioxidant in the biological system [47] and attenuates lipid peroxidation caused by various forms of free radicals [48]. In particular, EGCG reduces neuronal cell death caused by transient global ischemia [49], A β -induced neurotoxicity and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolo propionate-induced calcium influx and neuronal cell damage [50], all of which are associated with increased oxidative stress. It was reported that long-term administration of green tea catechins reduces

hippocampal lipid peroxidation and reactive oxygen species levels and increases the ferric-reducing antioxidant power of plasma in rats. These changes demonstrated improved age-related cognitive decline in rats [51].

Metabolism of green tea catechins has been studied in animal [52] and human [53, 54] subjects. After oral administration, EGCG is detected as free EGCG, its conjugates or both and peaks at 1–2 "h" after dose administration in rat systemic circulation [54,55]. Studies with radioactively labeled EGCG in mice [56] or chemiluminescence-based detection in rats also demonstrated its incorporation into the brain and into other organs, such as the kidney, heart, liver, spleen and pancreas. EGCG has a stronger antioxidant activity as compared with either vitamin E or C on a molar basis *in vitro* [11]. Furthermore, in reducing ferrous ion-induced lipid peroxidation, the IC₅₀ values of several antioxidants are as follows: 3.32 μ M for EGCG, 75.65 μ M for trolox, 7.63 μ M for lipoic acids and 15.48 μ M for melatonin [54, 57].

It was reported by Abdul *et al.* [58] that the intake volume of Poly E-mixed water was approximately 60 ml/kg/day in the 0.5% Poly E1 group. Based on this water volume intake, a person (with a body weight of 50 kg) would have to drink about 3 "L" of Poly E per day to get similar effects. However, humans consume antioxidants (including vitamins A, B, C and E as well as polyphenols, etc.) from various food sources everyday. Therefore, a lower amount of 0.5% Poly E1-mixed water volume intake may be effective in humans to ensure the similar effects. However, detailed investigation is certainly required to understand the fate of catechins in humans.

CONCLUSION

Our results suggest that long-term administration of Poly E prevents negative behaviour changes probably caused by oxidative stress, at least by facilitating antioxidative defenses. However, further research is required to clarify the exact mechanism of how Poly E contributes to the prevention of damages in CMS depression model.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was done as part of the national research project in Algeria (CNEPRU).

Authors' Contributions: Hacène FRIH: writing and analysis; Bachir ALI RACHEDI: writing and analysis; Samir DJEMLI: Statistical ANALYSIS and Graphics; FRAIA Asma and Zouiche Sabrina: execution of the protocol.

Conflict of Interest Disclosure: No conflict of interest

REFERENCES

1. Van Praag, H.M., 2004. Can stress cause depression? Progress in Neuro-Pharmacology and Biological Psychiatry, 28: 891-907.
2. American Psychiatric Association. Diagnostic and statistical manual for mental disorders. (DSM), 2000. 4th edition. Washington DC: American Psychiatry Press, Inc.
3. Oguzhanoglu, N.K., G. Sozeri-Varma, F. Karadag, S. Tumkaya, M. Efe and Y. Kiroglu, 2014. Prefrontal cortex neurochemical metabolite levels in major depression and the effects of treatment: an HMRS study. Turk Psikiyatri Derg., 25(2): 75-83.
4. Frih, H., L. Sahraoui, N. Frih, L. Toumi, A.M. Bairiand A. Tahraoui, 2009. Facteurs prédictifs de la survenue du stress post-traumatique chez des individus ayant vécu deux événements de vie majeurs (tremblement de terre et terrorisme en Algérie): réponse corticotrope et prolactinique à une faible dose de dexaméthasone (0,5 mg). L'Évol. Psychiatr. 74: 581-591.
5. Fava, G.A., N. Sonino and M.A. Morphy, 1987. Major depression associated with endocrine disease. Psychiatr Dev., 5(4): 321-48.
6. Nemeroff, C.B., 1988. The role of corticotropin-releasing factor in the pathogenesis of major depression. Pharmacopsychiatry, 21: 76-82.
7. Frih, H., R. Djenidi, B. Ali Rachedi, N. Frih and A. Tahraoui, 2010. Le kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat m♂le Wistar. Can. J. Physiol. Pharmacol., 88(7): 733-744.
8. Filomeni, G. and M.R. Ciriolo, 2006. Redox control of apoptosis: an update. Antioxid Redox Signal., 8(11-12): 2187-92.
9. Vargas, G.A. and P.A. Arnett, 2013. Attributional style and depression in multiple sclerosis: the learned helplessness model. Int J. MS are., 15(2): 81-9.
10. Willner, P., 1997. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. Psychopharmacology, 134: 319-29.
11. Rice-Evans, C.A., 1999. Implications of the mechanisms of action of tea polyphenols as antioxidants *in vitro* for chemoprevention in humans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 220: 262-6.
12. Marfak, A., 2003. Radiolyse gamma des flavonoides: Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation des depsides. Thèse de doctorat de l'université de Limoges, pp: 24-42.
13. Vitor, R.F., H. Mota-Filipe and G. Teixeira, 2004. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. J. Ethnopharmacol., 93(2-3): 363-370.
14. Khan, N., F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad and H. Mukhtar, 2006. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. Cancer Res., 66: 2500-2505.
15. Yun, T.K., Y.S. Lee, Y.H. Lee, S.I. Kim and H.Y. Yun, 2001. Anticarcinogenic effect of *Panax ginseng* C. A. Meyer and identification of active compounds. J. Korean Med. Sci., 16: 6-8.
16. Casarotto, P.C. and R. Andreatini, 2007. Repeated paroxetine treatment reverses anhedonia by chronic mild stress or dexamethasone. Eur Neuropsychopharmacology, 17(11): 735-42.
17. Willner, P., 2005. Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. Neuropsychobiology, 52: 90-110.
18. Montgomery, K.C., 1955. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. J. Comp. Physiol. Psychol., 48: 254-260.
19. Porsolt, R.D., M. LePichon and M. Jalfre, 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. Nature., 266: 730-732.
20. Garcia-Diaz, E.C., L.E. Gomez-Quiroz, E. Arenas-Rios, A. Aragon-Martinez, J.A. Ibarra-Arris and M.D. Retana-Marquez, 2015. Oxidative status in testis and epididymal sperm parameters after acute and chronic stress by cold-water immersion in the adult rat. Syst Biol. Reprod. Med., 2: 1-11.
21. Bratt, A.M., S.P. Kelly, J.P. Knowles, J. Barrett, K. Davis and M. Davis, 2001. Long term modulation of the HPA axis by the hippocampus behavioral, biochemical and immunological endpoints in rats exposed to chronic mild stress. Psychoneuroendocrinol., 26: 121-45.

22. Rabin, D., P.W. Gold and A. Margioris, 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, pp: 377-390.
23. Rivier, C., J. Rivier and W. Vale, 1986. Stress-induced inhibition of reproductive function: Role of endogenous corticotropin releasing factor. *Science*, 231: 607-609.
24. Chrousos, G.P., D.J. Torpy and P.W. Gold, 1998. Interactions between the hypothalamic pituitary adrenal axis and the female reproductive system: Clinical implications. *Annals of Internal Medicine*, 129(3): 229-240.
25. Detke, M.J. and I. Lucki, 1995. Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the rat forced swimming test: The effects of water depth. *Behav. Brain Res.*, 73: 43-46.
26. Nic Dhonnchadha, B.A., M. Bourin and M. Hascoët, 2003. Anxiolytic-like effects of 5-HT₂ ligands on three mouse models of anxiety. *Behav Brain Res.*, 140: 203-214.
27. Pintana, H., N. Chattipakom and S. Chattipakom, 2015. Testosterone deficiency, insulin-resistant obesity and cognitive function. *Metab Brain Dis.* (in press).
28. Filova, B., M. Malinova, J. Bavckova, L. Toyhova, D. Ostatnikova, P. Celec and J. Hodosy, 2015. Effects of testosterone and estradiol on anxiety and depressive-like behavior via a non-genomic pathway. *Neurosci Bull* (in press).
29. Carrier, N., S.K. Saland, F. Duclot, H. He, R. Mercer and M. Kabbaj, 2015. The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biol. Psychiatry* (in press).
30. Mitchell, J.B. and M.J. Meaney, 1991. Effects of corticosterone on response consolidation and retrieval in the forced swim test. *Behav. Neuro Sci.*, 105: 798-803.
31. Baez, M. and M. Volosin, 1994. Corticosterone influences forced swimming induced immobility. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 49: 729-736.
32. Veldhuis, H.D., C.C. De Korte and E.R. De Kloet, 1985. Glucocorticoids facilitate the retention of acquired immobility during forced swimming. *Eur. J. Pharmacol.*, 115(2-3): 211-7.
33. De Kloet, E.R., S. De Kock, V. Schild and H.D. Veldhuis, 1988. Antiglucocorticoid RU38486 attenuates retention of a behavior and disinhibits the hypothalamic-pituitary adrenal axis at different brain sites. *Neuroendocrinology*, 47(2): 109-15.
34. Veiga, S., L.M. García-Segura and I. Azcoitia, 2004. The neuroprotective properties of sex steroids and neurosteroids. *Rev. Neurol.*, 39: 1043-51.
35. Elder, G.A., R. De Gasperi and M.A. Gama Sosa, 2006. Research update: neurogenesis in adult brain and neuropsychiatric disorders. *Mt Sinai J. Med.*, 73: 931-40.
36. Vollmayr, B., M.M. Mahlstedt and F.A. Henn, 2007. Neurogenesis and depression: what animal models tell us about the link. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.*, 257: 300-3.
37. Bremner, J.D., M. Narayan, E.R. Anderson, L.H. Staib, H.L. Millar and D.S. Charney, 2000. Hippocampal volume reduction in major depression. *Am. J. Psychiatry*, 157: 115-7.
38. Bisgaard, C.F., M.N. Jayatissa, J.J. Enghild, C. Sánchez, R. Artemychny and O. Wiborg, 2007. Proteomic investigation of the ventral rat hippocampus links DRP-2 to escitalopram treatment resistance and SNAP to stress resilience in the chronic mild stress model of depression. *J. Mol. Neurosci.*, 32: 132-44.
39. Bergström, A., M.N. Jayatissa, T. Thykjaer and O. Wiborg, 2007. Molecular pathways associated with stress resilience and drug resistance in the chronic mild stress rat model of depression. *J. Mol. Neurosci.*, 33: 201-15.
40. Smith, R.G., L. Betancourt and S. Yuxiang, 2005. Molecular endocrinology and physiology of the aging central nervous system. *Endocr Rev.*, 26: 203-50.
41. Hayashi, M., F. Mistunaga, K. Ohira and K. Shimizu, 2001. Changes in BDNF-immunoreactive structures in the hippocampal formation of the aged macaque monkey. *Brain Res.*, 918: 191-6.
42. Cavus, I. and R.S. Duman, 2003. Influence of estradiol, stress and 5HT_{2A} agonist treatment on brain derived neurotrophic factor expression in female rats. *Biol. Psychiatry*, 54: 59-69.
43. Cameron, H.A. and R.D. McKay, 1999. Restoring production of hippocampal neurons in old age. *Nat. Neurosci.*, 2: 894-7.

44. Tanapat, P., N.B. Hastings, A.J. Reeves and E. Gould, 1999 . Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J. Neurosci.*, 19: 5792-801.
45. Yesavage, J.A., J. Davidson, L. Widrow and P.A. Berger, 1985. Plasma testosterone levels, depression, sexuality and age. *Biol. Psychiatry*, 20: 222-5.
46. Shores, M.M., K.L. Sloan, A.M. Matsumoto, V.M. Mocerri, B. Felker and D.R. Kivlahan, 2004 . Increased incidence of diagnosed depressive illness in hypogonadal older men. *Arch. Gen. Psychiatry*, 61: 162-7.
47. Choi, Y.T., C.H. Jung, S.R. Lee, J.H. Bae, W.K. Baek and M.H. Suh, 2001. The green tea polyphenol (-) epigallocatechin-3-gallate attenuates beta-amyloid induced neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Life Sci.*, 70: 603-14.
48. Gau, Q., B. Zhao, M. Li, S. Shen and W. Xin, 1996. Studies on protective mechanisms of four components of green tea polyphenols against lipid peroxidation in synaptosomes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1304: 210-22.
49. Lee, S., S. Suh and S. Kim, 2000. Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett.*, 287: 191-4.
50. Bae, J.M., K.C. Mun, W.K. Park, S.R. Lee, S.I. Suh and W.K. Baek, 2002. EGCG attenuates AMPA-induced intracellular calcium increase in hippocampal neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 290: 1506-12.
51. Haque, A.M., M. Hashimoto, M. Katakura, Y. Tanabe, Y. Hara and O. Shido, 2006. Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. *J. Nutr.*, 136: 1043-7.
52. Kohri, T., N. Matsumoto, M. Yamakawa, M. Suzuki, F. Nanjo and Y. Hara, 2001. Metabolic fate of (-)-[4-³H] epigallocatechin gallate in rats after oral administration. *J. Agric. Food Chem.*, 49: 4102-12.
53. Lee, S.R., K.J. Im, S.I. Suh and J.G. Jung, 2003. Protective effect of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate and other antioxidants on lipid peroxidation in gerbil brain homogenates. *Phytother. Res.*, 17: 206-9.
54. Kuriyama, S., A. Hozawa, K. Ohmori, T. Shimazu, T. Matsui and S. Ebihara, 2006. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project 1. *Am. J. Clin Nutr.*, 83: 355-61.
55. Unno, T. and T. Takeo, 1995. Absorption of (-) epigallocatechin gallate into the circulation system of rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 59: 1558-9.
56. Suganuma, M., S. Okabe, M. Oniyama, Y. Tada, H. Ito and H. Fujiki, 1998 . Wide distribution of [³H](-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis.*, 19: 1771-6.
57. Nakagawa, K. and T. Miyazawa, 1997 . Absorption and distribution of tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, in the rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 43: 679-84.
58. Abdul, M., M.H. Haque, K. Masanori, H. Yukihiko and S. Osamu, 2008. Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by A β 1-40 in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19: 619-626.

Publication II

Assessment of Steroids Changes (Testosterone and Oestradiol) After BCG

Inoculation in Sciatic Nerve Injury Model (Male Wistar Rat)

Assessment of Steroids Changes (Testosterone and Oestradiol) After BCG Inoculation in Sciatic Nerve Injury Model (Male Wistar Rat)

*Moncef Zaafour, Asma Fraia, Hacène Frih, Selma Guernine,
Samir Djemli and Bachir Ali Rachedi*

Department of Biology, Faculty of Science,
University Badji Mokhtar, Annaba, BP 12 El Hadjar, Algeria

Abstract: Half of patients with neuropathic pain develop mood disorders such as depression and anxiety, but the mechanisms that underlie this comorbidity are not fully understood. We opted for an experimental approach based on activation of the immune system in rats with injured sciatic nerve and explore the gonadotropic axis in order to achieve the following objectives:- try to show that there are links between the immune system and the neuroendocrine system through measures of some neurobiological parameters (time swimming, climbing and immobility in the forced swimming test) and hormonal (testosterone and oestradiol),- attempt to explain the mechanisms involved in the onset of mood disorders in ligated animals (injury sciatica) and treated with BCG. In our study we induced neuropathic pain associated with activation of the immune system by injection of 0.02 ml BCG or immuno-suppression by injection of 0.02 ml (20mg/kg) of Cyclosporin A (CsA). The means of investigation have been measuring the level of depression using Porsolt swim test (Forcing Swimming Test) and assessment of steroid hormones (testosterone and oestradiol) by the ELISA method. Our results showed that ligation has no effect on the forced swimming after 10 and 20 days post-surgery, whereas after 30 days it exerts an antidepressant effect. BCG treatment comes in two stages, an early phase depressogenic-like and late phase antidepressant-like. These effects are associated with hormonal variations (testosterone and oestradiol). Activation of the immune system (BCG) increases the testosterone level and decreases oestradiol's. Conversely, immunosuppression (CsA) counteracts these effects and causes a decrease in testosterone and an increase of oestradiol. There are neuro-immune-endocrine mechanisms responsible deleterious or beneficial effects in the living organism. Otherwise, these mechanisms will result in a disruption of homeostasis and lead to mood disorders.

Key words: Sciatic Nerve Injury • BCG • Forced Swimming Test • Testosterone • Oestradiol • Depression

INTRODUCTION

Half of patients with neuropathic pain develop mood disorders such as depression and anxiety [1, 2], but the mechanisms that underlie this comorbidity are not fully understood. The accumulation of evidence suggesting a role for the inflammatory immune component in the etiology of the underlying depression [3]. Depression is a mood disorder characterized by clinical symptoms listed in the DSM IV (Diagnostic Statistics Manual) such as low self-esteem and loss of pleasure or interest in activities that are usually experienced as pleasant by individual.

In addition to the psychological characteristics, many studies have established a neurobiological component of depression. Thus, it was observed a hyperactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) in patients with depression [4]. In fact, these patients have increased plasma and urinary cortisol levels and a markedly elevated levels of CRH (Corticotrophin-Releasing Hormone) in the cerebrospinal fluid [5-7]. Cortisol being unable to stop the production of ACTH and CRH, the hypothesis of a dysfunction of the negative feedback of the HPA axis in depression has been suggested [8, 9].

The involvement of monoamines in depression was also proposed after the observation that some substances capable of inducing their depletion resulted the development of depressive symptoms [10]. In addition, depression may be associated with alterations in the cerebral production of serotonin (5-HT), noradrenalin (NA) and dopamin (DA) [11-13]. Reduced concentrations of NA and 5-HT were observed in the cerebrospinal fluid of depressed patients [14-16].

The relationship between the immune system and depression has been a number of studies showing that depression was associated with impaired functioning of the immune system [17-19]. *In vitro* it has been shown that this immunosuppression was characterized by a reduction in the proliferation of T and B lymphocytes as well as the NK cell activity [18, 20]. In addition, it has been observed an increased plasma production of inflammatory cytokines: IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-10 and IFN-gamma [21, 22] and that increased concentrations of IL-1 α and IL-6 in the cerebrospinal fluid of patients with depressive disorders [23]. This strong cytokine production correlates with the severity of mood disorders. It has been suggested that activation of the immune system may be involved in the pathogenesis of major depression [24-26]. In addition, the observation that a third of patients with cancer or hepatitis C and subjected to immunotherapy develop mood disorders, supports the theory of a relationship between cytokines and depression [27, 28].

Under certain conditions such as infection or in chronic conditions including an inflammatory component, or experimental inoculation of bacteria (lipopolysaccharide: LPS, AIF, or BCG) activation of the immune system can lead to the development of disorders mood [29]. Clinical data show that the intensity of mood disorders frequently observed in the administration of therapeutic inflammatory cytokines is correlated to the decrease of circulating levels of the amino acid precursor of serotonin, tryptophan (Trp) [27, 28].

From all the data, we opted for an experimental approach based on activation of the immune system in rats with injured sciatic nerve and explore the gonadotropic axis in order to achieve the following objectives:

- try to show that there are links between the immune system and the neuroendocrine system through measures of some neurobiological parameters (time swimming, climbing and immobility in the forced swimming test) and hormonal (testosterone and oestradiol),

- attempt to explain the mechanisms involved in the onset of mood disorders in ligated animals (injury sciatica) and treated with BCG.

MATERIAL AND METHODS

Biological Material: Our biological material is male Wistar rat aged about six (06) months and average weight of 250g \pm 10g purchased from the Pasteur Institute of Algiers.

The animals were raised in polyethylene cages. They underwent an adjustment period of four (04) weeks in the environmental conditions of the experiment room (natural photoperiod, humidity, temperature, etc...). Their food consisted of corn, barley, milk and vitamin supplements. Drinking water is served *ad libitum*.

The rats were subjected to natural photoperiodic regime. Because of the extreme susceptibility to stress response systems to all kinds of aggression, we attached great importance to the conditions of daily manipulation and the environment where the noise is reduced. The animals were handled by the same experimenters. The rats were randomly divided into four (04) groups: control (n=8), sciatic nerve ligation group (Lig) (n=8), sciatic nerve ligation treated with BCG (Lig+BCG) (n=8) and sciatic nerve ligation treated with BCG+cyclosporin (Lig+BCG+CsA) (n=8).

Sciatic Nerve Ligation « sciatic Nerve Injury »: The rat model *Ratus ratus* Wistar strain underwent ligation of the sciatic nerve while the sural nerve left intact. The results lesions of hypersensitivity is marked in the lateral region of the leg that is innervated by the sural nerve was spared. The non-operated side of the rat was used as control.

The rats suffered surgery "sciatic nerve ligation" (*sciatic nerve injury*). Following this operation, the subjects received a treatment with anti-Cyclin at a dose of 0.3 ml per day for five (05) days by intraperitoneal injection, after a period of complete rest for ten (10) days (including days of treatment antibiotic) before restarting a second battery of tests similar to the previous one. At the end of the second battery, the rats were injected with 0.02 ml of BCG and experimental protocol resulted with a third and final set of tests.

Experimental Protocol

Anesthesia:

- Rats anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine 0.3ml / 100g + a drop orally Largactil (chlorpromazin).

- Animals placed in a calm and quiet place until fully anesthetized.
- Verification of rats reflexes by pinching the tip of the tail and legs with a pair of tweezers to ensure the immobility of animals before any surgery.
- Shaving drapes (using an electric razor) slightly below the knee area to the hip area.
- Application of an ophthalmic ointment to the eyes of animals using a cotton swab.
- The animal was placed on its right side (or left) and placement of the left hind limb (or right) on a small platform in order to keep it high. Leg fixation with tape.
- Disinfection of the operative field with alternating scrubs of ethanol and betadine outside the surgical site.

Surgery:

- Location knee with the thumb of the left hand and use a scalpel to make an application. A few cm incision in the proximal longitudinal direction of the knee.
- Open the skin by blunt dissection using the tip of a pair of sterilized scissors.
- Separation of the muscular layer by dissection just next to the clearly visible blood vessel, close to the femur (thigh bone). The muscle layers are easily separated without bleeding, revealing the sciatic nerve right or left below the muscle.

It should be noted that in case of bleeding due to damage of a blood vessel near the knee, they must be sterilized using a cotton bud body to absorb the blood by pressing until the bleeding stops.

- Rat under a stereo microscope to gently separate the muscles with a pair of tweezers sterilized to clearly visualize the sciatic nerve.
- Identification of the area and the collateral saphenous branches of the sciatic nerve knowing that the sural nerve is the smallest of the three branches.
- Creation of a surgical tight knot around the sciatic nerve. If the first node is a member of the tight contractions will be observed.
- Cut the suture ends with a pair of micro scissors and gently closing the muscle layer. Adding a drop of lidocaine on the wound and suture with surgical knots.

Post-surgery Period:

- Verification of the sufficiency of eye ointment.
- Rat placed in a clean cage under a paper towel in a comfortable posture to room temperature.
- Water and food are easily accessible for the animal operated.
- Intra-peritoneal injection of the antibiotic in a 0.3ml dose for five (05) days after surgery.
- Conduct a battery of behavioral tests (neuropathic pain and anxiety and depression measures) after ten (10) days of the surgery.

Application of Treatments

Treatments bacillus Calmette Guerin (BCG): The freeze-dried BCG vaccine comes from the cultivation of sub-strain of the bacillus Calmette Guerin Connaught, an attenuated strain of *Mycobacterium bovis* suspended in monosodium glutamate. BCG cultures were spread on Sauton growth medium, then mixed with the lyophilized monosodium glutamate. BCG cultures are viable upon reconstitution. BCG vaccine is provided as a multi-dose vials together with a diluent consisting of sterile saline buffered with phosphate containing 0.025% polysorbate 80. The concentration of the reconstituted vaccine is 8×10^5 - 32×10^5 colony forming units (CFU) per adult dose of 0.1 mL (= 0.1 mg BCG), equivalent to 4×10^5 - 16×10^5 CFU per child dose of 0.05 ml (= 0.5 mg BCG).

The dose of BCG (10^7 CFU / rat) was selected according to the indications given by Moreau *et al.*, (2008) [37]. The vaccine was administered intradermally (ID) in a volume of 0.02 ml / rat. Control rats received no injection.

Treatment with Cyclosporine (CsA): Cyclosporine is an immunosuppressive agent whose therapeutic use in the early 1980s, enabled a boom in the field of organ transplantation by preventing acute allograft rejection.

Today it is widely used in transplantation (skin, heart, kidney, lung, pancreas, bone marrow and small intestine), though challenged by newer molecules. Cyclosporine A is the main form of the drug. It is a cyclic peptide of eleven (11) amino acids synthesized by a microscopic fungus, *Tolypocladium niveum* (= *T. inflatum*) W. Gams. It contains amino acids dextrogyrous rarely encountered in nature.

Cyclosporine was administered intradermally (ID) in a volume of 0.02 ml / rat and, after 24 hours of injection of BCG.

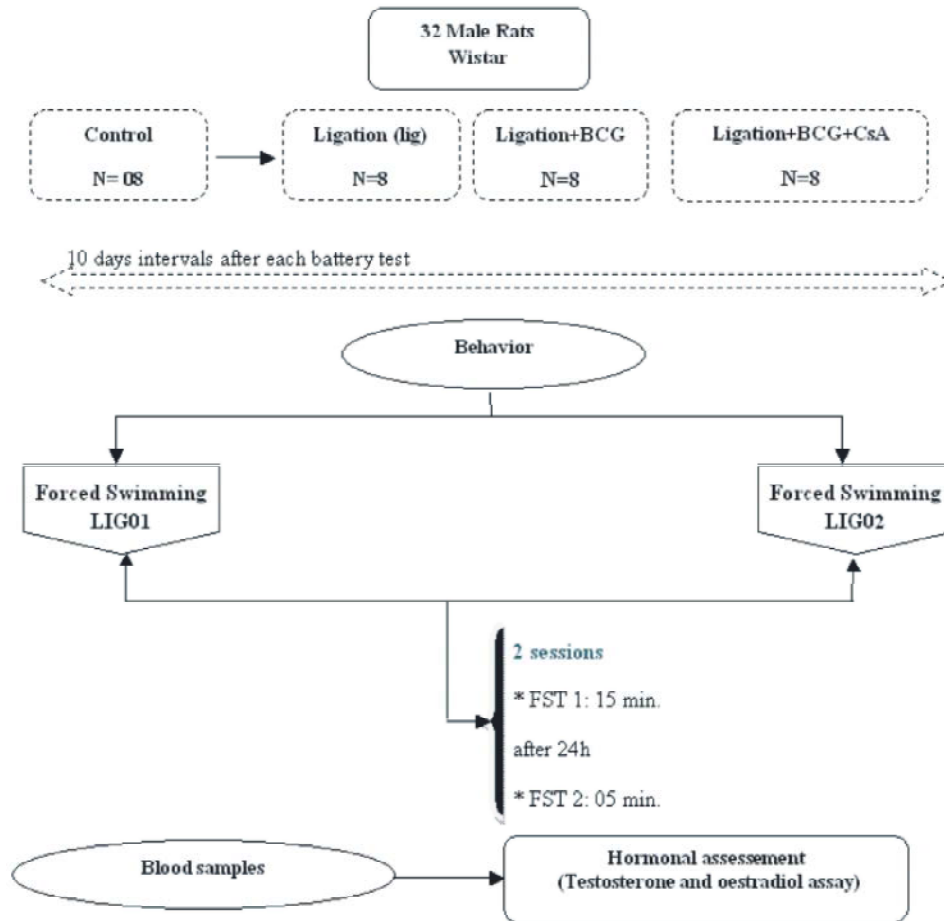


Fig. 1: Schematic illustration of the experiment

Forced Swimming Test: The forced swim test [31-33] is a behavioral test of inducing despair in rats by placing the animal 15min in a glass aquarium 54 cm height (34 × 60cm) . This dimension ensures that the rat can't escape by climbing to the edges of the device. The aquarium is filled with water (26 °C) to a height of 40 cm, in order to ensure that the rat will not use his legs to keep the surface and thus force him to swim. The procedure of forced swimming (FST) in rats occurs in two phases: the pre-test and test, separated by an interval of 24 hours. During the pre-test, the rat was placed for 15 min. At the end of session, the animal is immobile. The next day, the animal plunged into the aquarium for 5 min. The swimming session on each day was videotaped for behavioral analysis. The time of immobility, swimming and climbing are calculated.

Blood Sample Collection and Hormonal Assays (Testosterone and Oestradiol): Retro-orbital blood samples were collected. Blood samples were centrifuged

at 5000 rpm to be used for hormone assays of testosterone and oestradiol, which measured these levels by the BIOTECH conventional ELISA test kit, with a TECAN ELISA reader equipped with Magellan computer software that automatically calculates the standard range and provides the value of the hormone to the desired unit directly.

Statistical Analysis: Data are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA and Newman and Keuls or Benferroni as the post hoc test. Results were considered significant at $p < 0.05$. Graph Pad Prism 5 for windows version 5.01 was used to do the analysis.

RESULTS

Evolution of Forced Swimming Test Parameters: Immobility time (sec), Swimming time (sec) and climbing time (sec) in control, LIG and LIG+BCG groups:

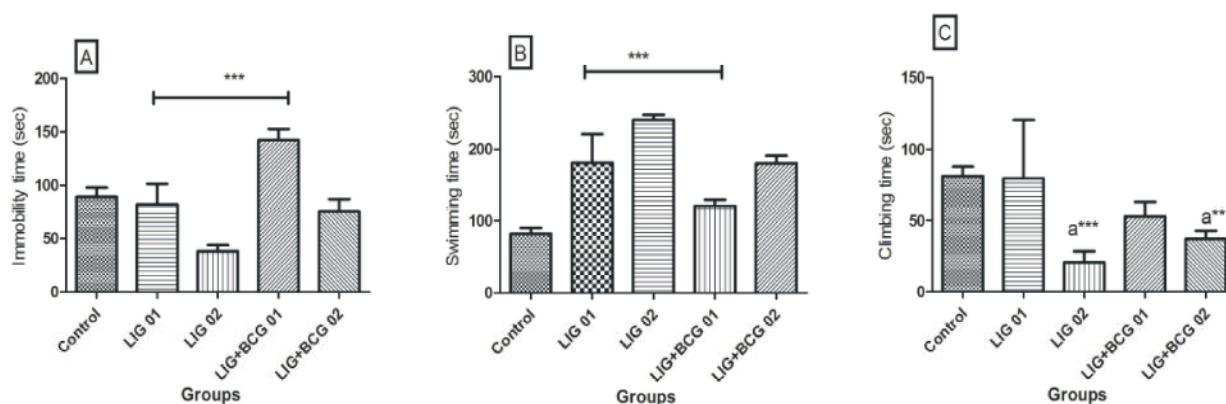


Fig. 2: Evolution of forced swimming test parameters: Immobility time (A)(sec), Swimming time (sec)(B) and climbing time (sec)(C) in control, LIG and LIG+BCG groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

The ANOVA1 for the immobility time (C) reported a significant effect of ligation and treatment ($F = 3.671$; R squared = 0.186; $p < 0.0048$). The Newman-Keuls test indicated a significant increase in immobility time in LIG01 vs BCG01 ($q = 5.759$, $p < 0.05$).

ANOVA 1 for swimming time (A) reported a significant effect of ligation and treatment ($F = 18.16$; R squared = 0.531; $p < 0.0001$). The Newman-Keuls test indicated a significant increase in swimming time in LIG01+BCG vs LIG01 ($q = 5.996$, $p < 0.05$).

The ANOVA1 for climbing time (B) reported a significant effect of ligation and treatment ($F = 4.114$; R squared = 0.189; $p < 0.0021$). The Newman-Keuls test indicated a significant decrease in climbing time in LIG02 vs controls ($q = 4.776$, $p < 0.05$); LIG+BCG02 vs control ($q = 3.963$, $p < 0.05$).

Variation of testosterone (ng/ml) and oestradiol (ng/ml) levels in control, LIG and LIG+BCG groups

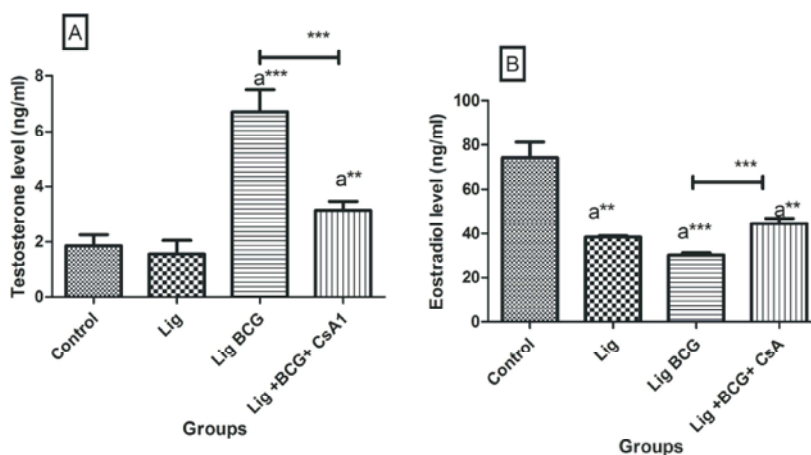


Fig. 3: Variation of testosterone (ng/ml) and oestradiol (ng/ml) levels in control, LIG and LIG+BCG groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

ANOVA 1 for testosterone reported a significant effect of ligation and treatment ($F = 16.8$; R squared = 0.657; $p < 0.0001$). The Newman-Keuls test indicated a significant increase in testosterone levels in LIG vs LIG+BCG ($q = 10.27$, $p < 0.05$); by cons there is a significant decrease in LIG+BCG + CsA vs LIG+BCG ($q = 6.791$, $p < 0.05$).

ANOVA 1 for oestradiol levels reported a significant effect of ligation and treatment ($F = 26.73$; R squared = 0.810; $p < 0.0001$). The Newman-Keuls test indicated a significant decrease in oestradiol levels LIG+BCG vs control ($q = 13.20$, $p < 0.05$); LIG+BCG+ CsA vs control ($q = 8.86$, $p < 0.05$), by cons there is a significant increase in lots: LIG+BCG vs LIG+BCG+CsA ($q = 4.337$, $p < 0.05$).

DISCUSSION

Activation of the immune system in patients is associated with an increased prevalence of symptoms of depression [33]. In this study, we used the BCG inoculation to induce chronic activation of the immune system.

As such, we analyzed the neuropharmacological effects, the test level forced swim or FST (Forced Swimming Test). The FST is an animal model of depression which represents an aversive stressful situation where rats can not escape and produces a stillness, that is to say, a behavioral despair [33, 34]. The antidepressant drug profile can be examined using an FST, which is one of the most commonly used tests to evaluate antidepressant activity because it is sensitive to all major classes of antidepressant drugs [35]. In the FST, rats show active behavior, that is to say, swimming and climbing, as well as passive, that is to say still. Molecules which decrease the duration of immobility in the FST are considered effective antidepressants [33, 35].

In our results concerning the FST we found that after 30 days (post ligation) lesion of sciatica causes an antidepressant effect expressed by the decrease in the immobility time. The combination of BCG (immune stimulation) in neuropathic pain (sciatic injury) shows that BCG causes spatiotemporal evolution of the forced swimming parameters, with a depressant-like effect during the first phase (10 days post BCG) then the opposite effect antidepressant-like (after 20 days post BCG). These findings clearly show that BCG is acting in two phases: an early first phase (deleterious depressinogène-like according to FST) and a second late phase (restorative antidepressant).

It has been shown that inoculation of BCG causes persistent activation of IDO (Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase) enzyme responsible for the degradation of tryptophan, the peripheral and brain level in rats up to three weeks, resulting in reduced levels of tryptophan and thus 5HT (serotonin) [36, 37]. This activation is mediated primarily by interferon gamma (IFN- γ) [38], which once again confirms the spatiotemporal evolution of the forced swimming.

In our results (Figs 2,3,4), we found that the reduction in the immobility time of the ligated rats treated with BCG is in favor of an increase in swimming time. This difference is very important since neuropharmacological theoretically during the FST, producing a noradrenergic antidepressants or dopaminergic predominant elevation,

reduced the immobility by increased climbing time and those that produce serotonin elevation reduce immobility time by increasing the swimming time [33, 38].

Steroid hormones, specifically testosterone and oestradiol, may also be involved in these behavioral disturbances. The results (Figs. 5,6) show that BCG leads to increased serum testosterone levels associated with decreased levels of oestradiol. Similar trends were obtained following treatment with Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). This leads us to think that it is rather non-specific immunity which is called to mind in these neurophysiological mechanisms causing degradation and / or repair. This is supported by the fact that treatment with an immunosuppressant (cyclosporin: CsA) counteracts the effects of BCG.

We may also report a hormonal conversion problem inter-steroid under the effect of activation of the immune system (Figs 5, 6) where the treatment with BCG (immune activation) causes an increase of testosterone and a decrease in oestradiol. Unlike the cyclosporin treatment (immunosuppression SI) results in a decrease in testosterone associated with an increase of oestradiol.

CONCLUSION

In our study, we tried to show that there are neuroanatomical mechanisms, multiple hormonal and molecular, through which the central nervous system communicates with the immune system and, in particular, with lymphocytes. Disturbances in the major neurotransmission systems of the Central Nervous System (dopamine, norepinephrine, serotonin) and the HPA axis, as observed in cases of psychiatric disorders, are dependent on changes in the functions and metabolism lymphocytes.

These changes are very sensitive to the expression of the neuroactive peptides such as neurotrophins (allo-pregnanolone), hormones and many cytokines and their receptors and their genes. The similarities in the properties of receptors and transduction process of lymphocytes and CNS suggest that cells could be used as basic tools (biomarkers) essential to research on CNS pathology in cases of psychiatric disorders.

Specific molecular methods to the analysis of gene expression in immune cells would allow us to study the interactions neuroimmunological in cases of psychiatric disorders and provide us with useful information about the potential of these cells.

REFERENCES

1. Maletic, V. and C.L. Raison, 2009. Neurobiology of depression, fibromyalgia and neuropathic pain. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed.)*, 1(14): 5291-5338.
2. McWilliams, L.A., B.J. Cox and M.W. Enns, 2003. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: an examination in a nationally representative sample. *Pain*, 106: 127-133.
3. Eyre, H. and B.T. Baune, 2012. Neuroplastic changes in depression: a role for the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, 37(9): 1397-1416.
4. Ströhle, A. and F. Holsboer, 2003. Stress responsive neurohormones in depression and anxiety. *Pharmacopsychiatry*, 36 Suppl. 3: S207-214.
5. Maes, M., A. Lin, S. Bonaccorso, F. van Hunsel, A. Van Gastel, L. Delmeire, M. Biondi, E. Bosmans, G. Kenis and S. Scharpé, 1998. Increased 24-hour urinary cortisol excretion in patients with post-traumatic stress disorder and patients with major depression, but not in patients with fibromyalgia. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 98: 328-335.
6. Banki, C.M., G. Bissette, M. Arato, L. O'Connor and C.B. Nemeroff, 1987. CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depression and schizophrenia. *American Journal of Psychiatry*, 144(7): 873-877.
7. Frih, H., L. Sahraoui, N. Frih, L. Toumi, M. Bairi, A. Tahraoui, D. Maurel and P. Siaud, 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 dexaméthasone (0,5 mg). *Évolution Psychiatrique de Paris*, 74(4): 581-591.
8. Sheline, Y.I., 2000. 3D MRI studies of neuroanatomic changes in unipolar major depression: the role of stress and medical comorbidity. *Biological Psychiatry*, 48(8): 791-800.
9. Pariante, C.M., 2003. Depression, stress and the adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 811-812.
10. Lemieux, G., A. Davignon and J. Genest, 1956. Depressive states during Rauwolfia therapy for arterial hypertension; a report of 30 cases. *Canadian Medical Association Journal*, 74(7): 522-526.
11. Schildkraut, J.J., E.K. Gordon and J. Durell, 1965. Catecholamine metabolism in affective disorders. I. Normetanephrine and VMA excretion in depressed patients treated with imipramine. *Journal of Psychiatric Research*, 3: 213-228.
12. Coppen, A., 1967. The biochemistry of affective disorders. *British Journal of Psychiatry*, 113: 1237-1264.
13. Lambert, G., M. Johansson, H. Agren and P. Friberg, 2000. Reduced brain norepinephrine and dopamine release in treatment-refractory depressive illness: evidence in support of the catecholamine hypothesis of mood disorders. *Archives of General Psychiatry*, 57(8): 787-793.
14. Bourne, H.R., W.E. Bunney Jr., R.W. Colburn, J.M. Davis, J.N. Davis, D.M. Shaw and A.J. Coppen, 1968. Noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid in hindbrains of suicidal patients. *Lancet*, 12, 2(7572): 805-8.
15. Beskow, J., C.G. Gottfries, B.E. Roos and B. Winblad, 1976. Determination of monoamine and monoamine metabolites in the human brain: post mortem studies in a group of suicides and in a control group. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 53(1): 7-20.
16. Djemli, S., B. Ali Rachedi, H. Frih and F. Sylvain, 2015. The Beneficial Effect of Zinc on Nickel-Induced Oxidative Stress Liver Injury in Rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*, 7(1): 26-33.
17. Kronfol, Z., J.R. Silva, J. Greden, S. Dembinski, R. Gardner and B. Carroll, 1983. Impaired lymphocyte function in depressive illness. *Life Sciences*, 33: 241-247.
18. Schleifer, S.J., S.E. Keller, A.T. Meyerson, M.J. Raskin, K.L. Davis and M. Stein, 1984. Lymphocyte function in major depressive disorder. *Archives of General Psychiatry*, 41: 484-486.
19. Frih, H., L. Bensaci, R. Djenidi, B. Ali Rachedi, A. Tahraoui and S. Fisson, 2013. Freund's Complete Adjuvant (FCA) Could Reverse the Depressive-Like Symptoms Induced by Chronic Mild Stress (CMS) in Mice. *Journal of Neurology and Neurophysiology*, 4: 143.
20. Irwin, M. and J.C. Gillin, 1987. Impaired natural killer cell activity among depressed patients. *Psychiatry Research*, 20: 181-182.
21. Seidel, A., V. Arolt, M. Hunstiger, L. Rink, A. Behnisch and H. Kirchner, 1995. Cytokine production and serum proteins in depression. *Scandinavian Journal of Immunology*, 41(6): 534-538.

22. Seidel, A., M. Rothermundt and L. Rink, 1999. Cytokine production in depressed patients. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461: 47-57.
23. Levine, J., Y. Barak, K.N. Chengappa, A. Rapoport, M. Rebey and V. Barak, 1999. Cerebrospinal cytokine levels in patients with acute depression. *Neuropsychobiology*, 40(4): 171-176.
24. Maes, M., 1995. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 19(1): 11-38.
25. Maes, M., 1999. Major depression and activation of the inflammatory response system. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 461: 25-46.
26. Frih, H., A. Chettoum, K. Guedri, N. Frih, B. Ali Rachedi, R. Djenidi and S. Fisson, 2014. Risk Factors of Mood Disorders (Depression and Anxiety) in Smoking Subjects: Reliability with the Age of Smoking Initiation and Inflammatory Processes. *Annual Research and Review in Biology*, 4(12): 1988-2006.
27. Bonaccorso, S., V. Marino, M. Biondi, F. Grimaldi, F. Ippoliti and M. Maes, 2002. Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *Journal of Affective Disorders*, 72(3): 237-241.
28. Capuron, L., A. Ravaut, P.J. Neveu, A.H. Miller, M. Maes and R. Dantzer, 2002. Association between decreased serum tryptophan concentrations and depressive symptoms in cancer patients undergoing cytokine therapy. *Molecular Psychiatry*, 7(5): 468-473.
29. Evans, D.L., D.S. Charney, L. Lewis, R.N. Golden, J.M. Gorman, K.R. Krishnan, C.B. Nemeroff, J.D. Bremner, R.M. Carney, J.C. Coyne, M.R. Delong, N. Frasure-Smith, A.H. Glassman, P.W. Gold, I. Grant, L. Gwyther, G. Ironson, R.L. Johnson, A.M. Kanner, W.J. Katon, P.G. Kaufmann, F.J. Keefe, T. Ketter, T.P. Laughren, J. Leserman, C.G. Lyketsos, W.M. McDonald, B.S. McEwen, A.H. Miller, D. Musselman, C. O'Connor, J.M. Petitto, B.G. Pollock, R.G. Robinson, S.P. Roose, J. Rowland, Y. Sheline, D.S. Sheps, G. Simon, D. Spiegel, A. Stunkard, T. Sunderland, P. Tibbits Jr. and W.J. Valvo, 2005. Mood disorders in the medically ill: scientific review and recommendations. *Biological Psychiatry*, 58(3): 175-189.
30. Moreau, M., C. André, C. O'Connor Jason, A. Dumich Sara, A. Woods Jeffrey, W. Kelley Keith, R. Dantzer, J. Lestage and N. Castanon, 2008. Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain, Behavior and Immunity*, 22: 1087-1095.
31. Porsolt, R.D., A. Bertin and M. Jalfre, 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie*, 229(2): 327-336.
32. Frih, H., R. Djenidi, B. Ali Rachedi, N. Frih, A. Tahraoui and M. Bairi, 2010. [Ketoconazole antagonizes the immune and gonadotropic systems in the forced swimming test in male Wistar rats]. [Article in French] Le kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(7): 733-744.
33. Funkiewiez, A., C. Ardouin, E. Caputo, P. Krack, V. Fraix, H. Klinger, S. Chabardes, K. Foote, A. Benabid and P. Pollak, 2004. Long term effects of bilateral subthalamic nucleus stimulation on cognitive function, mood and behaviour in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 75(6): 834-839.
34. Fraia, A., B. Ali Rachedi, S. Zouiche, S. Djemli and H. Frih, 2015. Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats. *Global Veterinaria*, 4(4): 478-489.
35. Porsolt, R.D., A. Bertin and M. Jalfre, 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales Pharmacodynamie et de Thérapie*, 229(2): 327-336.
36. Moreau, M., J. Lestage, D. Verrier, C. Mormede, K.W. Kelley, R. Dantzer and N. Castanon, 2005. Bacille Calmette-Guerin inoculation induces chronic activation of peripheral and brain indoleamine 2,3-dioxygenase in mice. *Journal of Infectious Diseases*, 192(3): 537-544.
37. Moreau, M., C. André, J.C. O'Connor, S.A. Dumich, J.A. Woods, K.W. Kelley, R. Dantzer, J. Lestage and N. Castanon, 2008. Inoculation of Bacillus Calmette-Guerin to mice induces an acute episode of sickness behavior followed by chronic depressive-like behavior. *Brain, Behavior and Immunity*, 22(7): 1087-1095.
38. Fujigaki, Y., T. Goto, M. Sakakima, H. Fukasawa, T. Miyaji and T. Yamamoto, 2006. Kinetics and characterization of initially regenerating proximal tubules in S3 segment in response to various degrees of acute tubular injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21: 41-50.

Publication III

Physiologic and Behavioral Assessment of Sciatic Nerve Injury in Wistar Rat Model Treated with Freund's Incomplete Adjuvant

Physiologic and Behavioral Assessment of Sciatic Nerve Injury in Wistar Rat Model Treated with Freund's Incomplete Adjuvant

¹Aziez Chettoum, ²Asma Fraia, ²Hacène Frih, ²Bachir Ali Rachedi,
²Moncef Zaafour, ²Selma Guernine, ²Samir Djemli and ³Réda Djenidi

¹Department of Biology, University of Constantine, Algeria

²Department of Biology, Faculty of Science,
University Badji Mokhtar, Annaba, BP 12 El Hadjar, Algeria

³Department of Biology, University of Bordj Bou Arreridj, Algeria

Abstract: Major depression disorders are commonly seen in many medical diseases that share chronic inflammatory pain as a common denominator. Pains whether inflammatory or neuropathic, those caused by damage to the central or peripheral nervous system are the most difficult to treat due to their resistance to conventional analgesic treatments. In our study, we chose a model of neuropathic pain (sciatic nerve ligation) associated with intradermal injection of 0.02 ml of Freund's Incomplete Adjuvant (AIF) in order to achieve an activation of the innate immune system in male Wistar rats subsequently being tested of forced swimming (FST). Our study was completed by an endocrinological study highlighting the importance of sex steroids on the fluctuations of depression by hormonal assays (testosterone and estradiol). Our results showed that the ligation causes a highly significant increase in the depression 10 days postoperative. This is revealed by increased immobility time in the FST. This depression reported among ligated tends to be mitigated over time there has been a significant decrease in twenty days following ligation. Treatment with AIF is in 2 phases: 1st where we see a depressive-like behavior due to the activation of the immune system that causes inflammation and a 2nd phase where there is a less depression antidepressant-like and the inflammation disappears after 20 days. This is also associated with hormonal changes or there is a significant increase in the level of testosterone in subjects ligated and treated (AIF) and a significant decrease of estradiol. These results then takes us to highlight the existence of neuro-immune-endocrine link that acts to benefit the body and restore homeostasis. In case of disruption these systems associated will cause depressive disorders also a major depression.

Key words: AIF • Neuropathic Pain • Inflammation • Testosterone • Estradiol • Depression

INTRODUCTION

The inflammatory response in a normal subject is a key means of protection against bacterial agents and is characterized by a natural balance between cytokines pro- and anti-inflammatory [1]. The four cardinal signs are: redness, heat, swelling and pain demonstrate the mobilization of host defenses [2]. There is a fundamental distinction between acute inflammation and chronic inflammation. Acute inflammation includes the immediate early response to aggression. Chronic inflammation

persists when the trigger or stimulation persists [3]. Peripheral inflammation can directly reach the Central Nervous System (CNS) via mediators of inflammation (interleukins and prostaglandins) that penetrate the brain areas through Blood-Brain Barrier (BBB) [4].

The pain can be considered as contributing to a protective function, an alarm signal, as a result of injury or trauma in peripheral tissue generating an inflammatory defense reaction. Kuner, 2010 reported that pain is one of the most common symptoms encountered in the clinic and inflammatory pain represents an important type of pain.

The latter may extend in time and cause chronic inflammatory pain, but may also involve a nerve causing neuropathic lesion and therefore chronic neuropathic pain. Pain loses its meaning alarm signal to become a disease in itself, a true syndrome.

In addition, more than half of patients with neuropathic pain develop mood disorders such as depression and anxiety as the external stress is widely recognized as a predisposing factor and trigger for depression [6-8]. It's well recognized that depression is accompanied by activation of the immune system, inflammatory and oxidative stress [9]. Especially when this neuronal inflammation is prolonged due to an unknown cause, especially undiagnosed, as an ancient and symptomatic chronic infection, it involves our cellular and humoral defenses, creating a biological disturbance generating oxidative stress. By "oxidative stress" is understood oxidative chemical attack, oxidation of the constituents of our body due to excess particularly harmful molecules called free radicals of oxygen [10, 11]. This oxidation denatures proteins, lipids, sugars and the same DNA and thereby the cell membranes and finally the cells [11]. It was also shown that the depression is one of the primary causes of hyperactivity of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) characterized by a negative feedback resistance of the glucocorticoid axis [13]. This would be a major player in the stress response [14].

Today the pains that they either inflammatory or neuropathic, those caused by damage to the Central or Peripheral Nervous System are the most difficult to treat due to their resistance to standard analgesic treatments. The treatments currently used involve not specifically targeted therapeutic classes on pain, especially antidepressants. Their limited effectiveness is in fact based on empirical observations. A better understanding of the pathophysiological processes underlying neuropathic pain, is a prerequisite for any therapeutic innovation [15].

In this case we applied to develop neuropathic pain model [7, 8] in rats by performing a ligation of the sciatic nerve at the level to study the behavioral characteristics through the forced swimming test parameters (time swimming, immobility and climbing) and hormonal assays (testosterone and estradiol). So we developed this experimental protocol in order to highlight the activation of the immune system by intradermal injection of Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) to demonstrate the links between the nervous immune and endocrine system.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material: Our biological material is male Wistar rat aged about six (06) months and average weight of $250 \pm 10g$ purchased from the Pasteur Institute of Algiers. The animals were raised in polyethylene cages. They underwent an adjustment period of four (04) weeks in the environmental conditions of the experiment room (natural photoperiod, humidity, temperature, etc ...). Their food consisted of corn, barley, milk and vitamin supplements. Drinking water is served *ad libitum*. The rats were subjected to natural photoperiodic regime. Because of the extreme susceptibility to stress response systems to all kinds of aggression, we attached great importance to the conditions of daily manipulation and the environment where the noise is reduced. The animals were handled by the same experimenters.

The animals were divided into three (03) experimental groups (n=08): Control (Have not suffered anything), Ligation (Sciatic nerve ligation under general anesthesia) and IFA (Intradermal tail injection of 0.02 ml Freund's incomplete adjuvant).

Sciatic Nerve Ligation «Sciatic Nerve Injury»: The rat model *Ratus ratus* Wistar strain underwent ligation of the sciatic nerve [7, 8] while the sural nerve left intact. The results lesions of hypersensitivity is marked in the lateral region of the leg that is innervated by the sural nerve was spared. The non-operated side of the rat was used as control.

The rats suffered surgery "sciatic nerve ligation" (*sciatic nerve injury*). Following this operation, the subjects received a treatment of antibiotics for five (05) days by intraperitoneal injection, after a period of complete rest for ten (10) days (including days of treatment antibiotic) before restarting a second battery of tests similar to the previous one. At the end of the second battery, the rats were injected with 0.02 ml of IFA and experimental protocol resulted with a third and final set of tests.

Anesthesia:

- Rats anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine 0.3ml / 100g + a drop orally of Largactil (chlorpromazin).
- Animals placed in a calm and quiet place until fully anesthetized.

- Verification of rats reflexes by pinching the tip of the tail and legs with a pair of tweezers to ensure the immobility of animals before any surgery.
- Shaving drapes (using an electric razor) slightly below the knee area to the hip area.
- Application of an ophthalmic ointment to the eyes of animals using a cotton swab.
- The animal was placed on its right side (or left) and placement of the left hind limb (or right) on a small platform in order to keep it high. Leg fixation with tape.
- Disinfection of the operative field with alternating scrubs of ethanol and betadine outside the surgical site.

Surgery:

- Location knee with the thumb of the left hand and use a scalpel to make an application. A few cm incision in the proximal longitudinal direction of the knee.
- Open the skin by blunt dissection using the tip of a pair of sterilized scissors.
- Separation of the muscular layer by dissection just next to the clearly visible blood vessel, close to the femur (thigh bone). The muscle layers are easily separated without bleeding, revealing the sciatic nerve right or left below the muscle.

It should be noted that in case of bleeding due to damage of a blood vessel near the knee, they must be sterilized using a cotton bud body to absorb the blood by pressing until the bleeding stops.

- Rat under a stereo microscope to gently separate the muscles with a pair of tweezers sterilized to clearly visualize the sciatic nerve.
- Identification of the area and the collateral saphenous branches of the sciatic nerve knowing that the sural nerve is the smallest of the three branches.
- Creation of a surgical tight knot around the sciatic nerve. If the first node is a member of the tight contractions will be observed.
- Cut the suture ends with a pair of micro scissors and gently closing the muscle layer. Adding a drop of lidocaine on the wound and suture with surgical knots.

Post-Surgery Period:

- Verification of the sufficiency of eye ointment.
- Rat placed in a clean cage under a paper towel in a comfortable posture to room temperature.
- Water and food are easily accessible for the animal operated.
- Intra-peritoneal injection of the antibiotic in a 0.3ml dose for five (05) days after surgery.
- Conduct a battery of behavioral tests (neuropathic pain and anxiety and depression measures) after ten (10) days of the surgery.

Treatment by the Incomplete Freund's Adjuvant (IFA):

Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) is composed of mineral oil and mannide monooleate emulsifier. This adjuvant, causes enhanced immunogenicity by increasing local inflammation stimulates the proliferation of non-specific lymphocytes and prolonging the persistence of the antigen [16]. In this context, the adjuvant plays an important role because it improves the recruitment of various types of immune system cells. Induces an increased expression of endogenous inflammatory cytokines [17].

The IFA used comes from the Pasteur Institute of Algiers. In our study, it was injected intradermally at the tail at a dose of 50 μ l / rat was reduced to 2 μ l / rat for the needs of the protocol, namely a stimulation of the immune response [18].

Blood Sample Collection and Hormonal Assays (Testosterone and Oestradiol):

Retro-orbital blood samples were collected. Blood samples were centrifuged at 5000 r/min to be used for hormone assays of testosterone and oestradiol, which measured these levels by the BIOTECH conventional ELISA test kit, with a TECAN ELISA reader equipped with Magellan computer software that automatically calculates the standard range and provides the value of the hormone to the desired unit directly.

Forced Swimming Test: The forced swim test [19, 20] is a behavioral test of inducing despair in rats by placing the animal 15min in a glass aquarium 54 cm height (34 \times 60cm). This dimension ensures that the rat can't escape by climbing to the edges of the device. The aquarium is filled with water (26°C) to a height of 40 cm, in order to ensure that the rat will not use his legs to keep the surface and

thus force him to swim. The procedure of forced swimming (FST) in rats occurs in two phases: the pre-test and test, separated by an interval of 24 hours. During the pre-test, the rat was placed for 15 min. At the end of session, the animal is immobile. The next day, the animal plunged into the aquarium for 5 min. The swimming session on each day was videotaped for behavioral analysis. The time of immobility, swimming and climbing are calculated.

Statistical Analysis of Results: Data are presented as mean \pm SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA and Newman and Keuls or Benferroni as the post hoc test. Results were considered significant at $p < 0.05$. Graph Pad Prism 5 for windows version 5.01 was used to do the analysis.

RESULTS

Effect of Ligation and IFA on Depressive-Like Behavior in the Swimming Test: The ANOVA1 for swimming time (A) reported a significant treatment effect ($F = 6.327$, $R \text{ square} = 0.5686$, $p < 0.0007$). The Newman-Keuls test indicated a significant increase in swimming time in lots: Lig vs Lig10 ($q = 5.096$, $p < 0.05$), Lig vs Lig 20 ($q = 7.007$, $p < 0.05$), Lig vs IFA 20 ($q = 4.282$, $p < 0.05$). By cons, we reported a significant decrease in groups: IFA 10 vs Lig20 ($q = 4.848$, $p < 0.05$), Lig vs control ($q = 5.388$, $p < 0.05$).

The ANOVA1 for the immobility time (B) reported a significant treatment effect ($F = 14.74$, $R \text{ square} = 0.7544$, $p < 0.0001$). The Newman-Keuls test indicated a significant increase in immobility time in groups: control vs Lig ($q = 10.88$, $p < 0.05$), control vs IFA 10 ($q = 6.322$, $p < 0.05$),

control vs Lig 10 ($q = 5.213$, $p < 0.05$) et Lig20 vs IFA 10 ($q = 3.814$, $p < 0.05$) and significantly decreased in lots: IFA 2 vs Lig ($q = 8.619$, $p < 0.05$), IFA 20 vs IFA 10 ($q = 4.065$, $p < 0.05$), Lig 10 vs Lig ($q = 8.368$, $p < 0.05$), IFA 10 vs Lig ($q = 4.553$, $p < 0.05$) and Lig 10 vs Lig ($q = 5.662$, $p < 0.05$).

The ANOVA1 for time climbing (C) did not report a significant treatment effect ($F = 1.378$, $R \text{ square} = 0.2230$, $p < 0.2677$).

Effects of Ligation and IFA on Hormonal Parameters
Variation in Plasma Testosterone Level (ng / ml): The ANOVA1 revealed a significant treatment effect on the testosterone level ($F = 9.183$, $R \text{ square} = 0.4440$). IFA has significantly increased the level of testosterone (Control vs Lig IFA: $q = 5.117$, $p < 0.05$), (Lig vs Lig IFA: $q = 5.733$, $p < 0.05$).

Variation in Plasma Estradiol Level (ng / ml): The ANOVA1 revealed a significant treatment effect on estradiol level ($F = 27.50$, $R \text{ square} = 0.7857$). Ligation significantly decreased the level of oestradiol (Lig vs Lig IFA: $q = 5.733$, $p < 0.05$), Control vs Lig IFA: $q = 5.117$, $p < 0.05$).

DISCUSSION

After our study the results obtained regarding the degree of depression show that: ligation causes a highly significant increase in the depression. This is revealed by increased immobility time in the FST (Fig. 1). We believe that this depression is induced by inflammation due to sciatic nerve ligation.

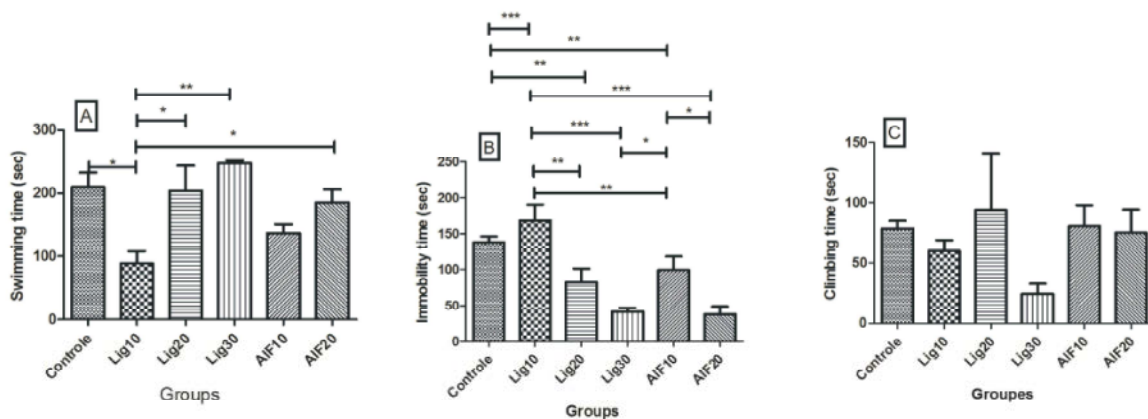


Fig. 1: Effect of ligation and IFA injection on forced swimming test parameters in the *Wistar* rats. One-way ANOVA and Newman-Keuls test multiple comparison test post hoc test were used to compare groups to another ($*p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$)

The FST is a widely used model in which behavioral change is induced by acute stress [21]. If the immobility time decreases or increases this is interpreted as depressive or antidepressive action [22]. In addition to immobility, animals exhibit behaviors that reflect active interest in actively try to avoid this aversive situation. Indeed, it has been reported that a large proportion of the individuals nervous system injury (sciatic nerve ligation) can lead to a debilitating chronic neuropathic pain, which is currently considered a neuro-immune disorder, since data recent indicate a critical involvement of the innate and adaptive immune responses in response to nerve injury [22].

The activation of immune cells (glia) in the injured nerve causes the release of two cytokines pro- and anti-inflammatory [23]. Smith (1991) was hypothesizes that cytokines proinflammatory IL-1 (interleukins) and IL-6, IFN γ (interferon) and Tumor Necrosis Factor (TNF α) in serum were treated as main symptoms of depression [25].

This depression reported in ligated, tends to be attenuated with time as a significant decrease is observed there of twenty (20) days after ligation. We justify this by the fact that the subjects were ligated suitable for inflammation with the intervention of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis *via* glucocorticoids such repair has been completed.

The activation of the HPA axis is triggered by an increased secretion of Corticotrophin Releasing Hormone (CRH) is attributable to proinflammatory cytokines [26, 27]. CRH stimulates the pituitary gland to secrete Adrenocorticotropin hormon (ACTH) in the bloodstream. The latter promotes the synthesis of glucocorticoids (cortisol in humans and corticosterone in rodents). Increased glucocorticoid regulates, in a negative way, the activity of the HPA axis and thus its own production through a negative feedback mechanism. They inhibit the release of ACTH, synthesis and release of CRH [28, 29].

Despite this adaptation reported previously, we see that after thirty (30) days some degree of residual depression persists. This explains the absence in the body of endogenous resources sufficient to overcome depression.

As such, it has been reported that the inflammation may extend over time and lead to chronic inflammatory pain, but can also affect nerve tissue causing neuropathic injury and therefore chronic neuropathic pain: pain loses its meaning alarm signal to become a disease in itself, a true syndrome [30]. We see then that the ligated subjects

seem to be permanently installed in a chronic depression process. In order to find ways to combat chronic neuroinflammation and therefore depression, we tried in subjects ligated stimulation of the immune system by Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). It appears from this test that the IFA is trying causes in a first stage inflammation which disappears after twenty (20) days.

IFA causes enhanced immunogenicity by increasing inflammation, by stimulating the proliferation of non-specific lymphocytes and the extension of the persistence of the antigen [31]. The administration of the IFA is to be considered in current and long-term. In the short term, the inoculation of the AIF causes a non-specific immune response that favors production of TNF, interferon the IFN γ , from IL-6, IL-17, IL -4, IL-10, IL-1 β and IL-2 [32]. Among the roles of IFN γ is activation of IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) this enzyme is highly expressed in humans and rodents, by dendritic cells and macrophages and by brain endothelial cells, astrocytes, microglia and neurons [33, 34]. IDO then inhibits the conversion of tryptophan which is a precursor amino acid biosynthesis of 5-HT (5-hydroxytryptamine). Tryptophan decreased rates resulting in a reduction of the synthesis of 5-HT and that decline may be involved in the development of mood disorders and also cause depression [35]. Thus, the immune reaction to long-term changes shape and is no longer expressed IFN γ which induces inhibition of IDO and thus recovery of the conversion of tryptophan where the biosynthesis of 5-HT in namely increased metabolism thereof and follows a decrease in depressive disorders.

Our results regarding the immobility time show a significant reduction thereof to the detriment of the swimming time. This depression is linked to a reduction in monoamine transmission, especially serotonin (5-HT) and noradrenaline (NA) [36], as well as by an increase in the dopaminergic transmission in the Central Nervous System (CNS) [37].

Our study was completed by an endocrinological study highlighting the importance of sex steroids on the fluctuations in the state of depression. Our results (Fig. 2) show a significant increase in the testosterone level in subjects IFA+lig20 and a significant decrease of estradiol in the same subjects, allowing us to assume that it is innate immunity who heckled the neurophysiological mechanisms leading exacerbation hence mitigating these depressive disorders. This means that testosterone plays an antidepressant-like effect while estradiol would have a depressant-like effect.

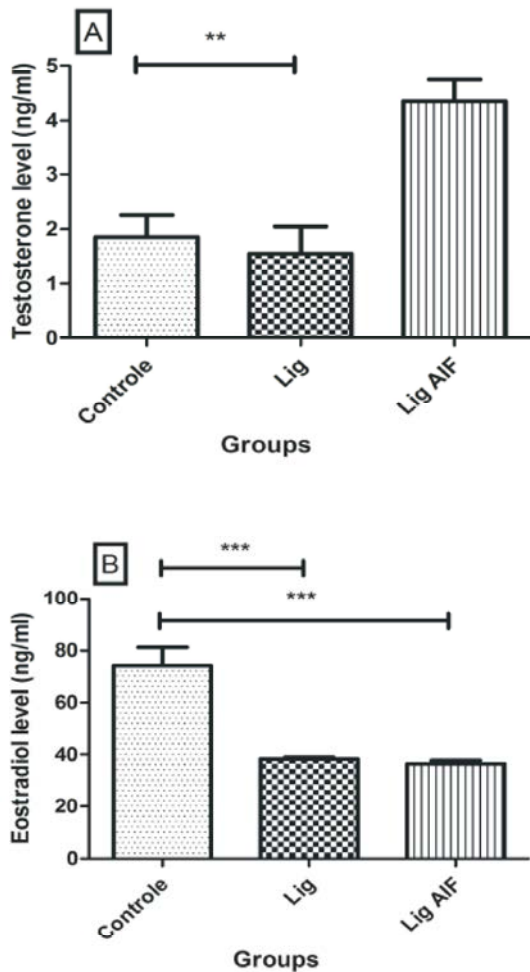


Fig. 2: Change in hormonal level testosterone (ng/ml)(A) and estradiol (ng/ml) (B) in the control rats, ligated and treated with AIF. One-way ANOVA and Newman-Keuls test multiple comparison test post hoc test were used to compare groups to another (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

The participation of sex steroids in mood disorders has often been documented and disruptions in the circulating levels of ovarian hormones produced behavior of depression [38], more behavioral changes associated with the estrous cycle, clearly showed a reduction of immobility and active behaviors highest active behavior during proestrus -estrus [39]. From these observations, it would appear that estrogen would have a depressing effect [40]. In these categories, the sources of estradiol may be gonads from the ovaries and testes that have a high content of aromatase (an enzyme that converts androgens into estrogen). The concentrations of estradiol in adult females and prepubertal rats could be related to

the reduction of immobility and its increase observed during the test, revealing activation of the serotonin system [41].

The administration of 17 β -oestradiol in the female or male rats increased the swimming and reduce immobility in the FST, the antagonist of the 5-HT1A receptor, blocks the antidepressant effect of estradiol in the FST [42, 43]. Other studies on the effect of estrogen antagonists on the swimming behavior should be conducted to determine the role of estrogen in the FST in young and adult rats. Also, it is well known that estrogens also have anti-inflammatory properties.

Studies in rats and mice have demonstrated the ability of estradiol to reduce tissue damage, while decreasing the expression of Th1 cytokines involved in the acute inflammatory response, such as Macrophage Migration Inhibitory Factor (MMF), TNF α , IL-1 β and IFN- γ [43, 44].

By cons, testosterone would anxiolytic and antidepressant-like effects [45, 46]. Recent reports show that in adult males, stress increases testosterone possibly by stimulating the secretion of gonadotropin. However, current data argue against this observation since the levels of this hormone are similar between the control animals and those exposed to FST. During inflammation, circulating cytokines suppress reproductive function by activating the secretion of hypothalamic CRH and therefore inhibiting ovarian and testicular steroidogenesis [47]. Activation of pro-inflammatory cytokines by altering neurotransmission of serotonin, is a component of the depression, although the anti-inflammatory cytokines regulate the inflammatory response by inhibiting the production and action of inflammatory cytokines [48].

CONCLUSION

Our study includes an experimental investigation to assess and explore the effect of sciatic nerve injury and injection AIF intradermally. The results obtained are consistent with those of some authors to know the inflammatory effect of sciatic nerve ligation and depressive-like effect of AIF in the forced swimming test.

Through these results we observed that:

- The males included in our experiment may acquire depressiogenic-like post sciatic nerve ligation (Neuro-inflammation) and this is revealed by the forced swimming test.

- The ligated subjects have shown an adaptative situation to neuro-inflammation is justified by the reduction of level of depression twenty days following ligation.
- Neuro-Inflammation can last in time and become chronic.
- We found through the results of the forced swim that administration of AIF would improve negative changes caused by sciatic nerve ligation (effect after 20 days).
- Sex steroids have an effect on the fluctuations of depressive behavior with antidepressant-like effect of testosterone and depressinogenic-like effect of estradiol.

REFERENCES

1. Munck, A., 2000. Mucoviscidose: inflammation, stress oxydant, infection. Essais de manipulation nutritionnelle [Cystic fibrosis: nutritional therapy against inflammation, oxidative stress and infection]. *Nutr. Clin. et Métabo.*, 14(3): 201-205.
2. Clarck, R.S.B., J.K. Shiding, S.L. Kaczorowski, D.W. Marion and P.M. Kochanek, 1994. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: accumulation of weight drop and controlled cortical impact model. *J. Neurotrauma*, 5: 499-506.
3. McGeer, P.L. and J. Rogers, 1992. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Neurology*, 42(2): 447-449.
4. Calvino, B., R. Trèves and F. Beroud, 2007. Douleur, inflammation et interactions système nerveux, système immunitaire. Institut Upsa De La Douleur, pp: 135, ID Notice 253063.
5. Kuner, R., 2010. Central mechanisms of pathological pain. *Nat Med.*, 16(11): 1258-66, doi: 10.1038/nm.2231.
6. Dellarole, A., P. Morton, B. Brambilla, W. Walters, S. Summers, D. Bernardes, M. Grilli and J.R. Bethea, 2014. Neuropathic pain-induced depressive-like behavior and hippocampal neurogenesis and plasticity are dependent on TNFR1 signaling. *Brain, Behavior and Immunity*, 41: 65-81.
7. Zaafour M., A. Fraia, H. Frih, S. Guernine, S. Djemli and B. Ali Rachedi, 2015. Assessment of steroids changes (testosterone and oestradiol) after BCG inoculation in sciatic nerve injury model (male Wistar rat). *Global Veterinaria* (in press).
8. Ali Rachedi, B., A. Fraia, H. Frih, M. Zaafour, S. Guernine and S. Djemli, 2015. Gender differences in the Prevalence of Depression (Persolt Swimming Test) in Sciatic Nerve Injury Model Wistar Rats. *Global Veterinaria* (in press).
9. Kubera, M., E. Obuchowicz, L. Goehler, J. Brzeszcz and M. Maes, 2011. In animal models, psychosocial stress-induced (neuro) inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 35: 744-759.
10. Fraia, A., B. Ali Rachedi, S. Zouiche, S. Djemli and H. Frih, 2015. Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats. *Global Veterinaria*, 4(4): 478-489.
11. Djemli, S., B. Ali Rachedi, H. Frih and F. Sylvain, 2015. The Beneficial Effect of Zinc on Nickel-Induced Oxidative Stress Liver Injury in Rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sci.*, 7(1): 26-33.
12. Gonfloni, S., E. Maiani, C. Di Bartolomeo, M. Diederich and G. Cesareni, 2012. Oxidative Stress, DNA Damage and c-Abl Signaling: At the Crossroad in Neurodegenerative Diseases? *International Journal of Cell Biology*, Article ID 683097, pp: 7.
13. Frih, H., L. Sahraoui, N. Frih, L. Toumi, M. Bairi, A. Tahraoui, D. Maurel and P. Siaud, 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 dexaméthasone (0,5 mg). *Évolution Psychiatrique de Paris*, 74(4): 581-591.
14. Rubin, R.T., A.J. Mandell and P.H. Crandall, 1966. Corticosteroid responses to limbic stimulation in man: localization of stimulus sites. *Sci.*, 153(3737): 767-8.
15. M'Dahoma, S., 2013. Spinal cord transection and intrathecal injection of BDNF: two relevant models of neuropathic pain in rats. *Human health and pathology. Université René Descartes- Paris*, pp: 211.
16. Singh, M. and D. O'Hagan, 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nature Biotechnology*, 17: 1075-1081.
17. Kensil, C.R., A.X. Mo and A. Truneh, 2004. Current vaccine adjuvants: an overview of a diverse class. *Front Biosci.*, 9: 2972-2988.
18. Zhang, Mia, Zheng, Hossain, Yamasaki, Tokunaga and Kohashi, 2001. The preventive effects of incomplete Freund's adjuvant and other vehicles on the development of adjuvant-induced arthritis in Lewis rats. *Immunology*, 98(2): 267-272.

19. Porsolt, R.D., M. Le Pichon and M. Jalfre, 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266: 730-732.
20. Frih, H., R. Djenidi, B. Ali Rachedi, N. Frih, A. Tahraoui and M. Bairi, 2010. [Ketoconazole antagonizes the immune and gonadotropic systems in the forced swimming test in male Wistar rats]. [Article in French] Le kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(7): 733-744.
21. Porsolt, R.D., G. Anton, N. Blavet and M. Jalfre, 1978. Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol.*, 47(4): 379-91.
22. Frih, H., L. Bensaci, R. Djenidi, B. Ali Rachedi, A. Tahraoui and S. Fisson, 2013. Freund's Complete Adjuvant (FCA) Could Reverse the Depressive-Like Symptoms Induced by Chronic Mild Stress (CMS) in Mice. *Journal of Neurology & Neurophysiology*, 4: 143.
23. Patterson, P.H., 2011. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol. Med.*, 17(7): 389-39.
24. Smith, R.S., 1991. The macrophage theory of depression. *Med Hypotheses*, 35(4): 298-306.
25. Pariante, C. and A.H. Miller, 2001. Glucocorticoid receptors in major depression: relevance to pathophysiology and treatment. *Biol Psychiatry*, 49(5): 391-404.
26. Gillies, G.E., E.A. Linton and P.J. Lowry, 1982. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature*, 299: 355-357.
27. Rivier, C. and W. Vale, 1983. Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology*, 113: 939-942.
28. Gary, W.E. and K. Pilyoung, 2013. Childhood Poverty, Chronic Stress, Self-Regulation and Coping. *Child Development Perspectives*, 7(1): 43-48.
29. Hinz, B. and R. Hirschelmann, 2000. Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm. Res.*, 17: 1273-1277.
30. Porreca, F., M.H. Ossipov and G.F. Gebhart, 2002. Chronic pain and medullary descending facilitation. *Trends Neurosci.*, 25(6): 319-25.
31. Singh, M., 2007. Vaccine adjuvants and delivery systems. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, pp: 449.
32. Vitoriano-Souza, J., N. Das Dores Moreira, A. Teixeira-Carvalho, C. Martins Carneiro, F.A.M. Siqueira, P.M. de Abreu Vieira, R.C. Giunchetti, S.M. De Lima Moura, R.T. Fujiwara, M.N. Melo and A.B. Reis, 2012. Cell Recruitment and Cytokines in Skin Mice Sensitized with the Vaccine Adjuvants: Saponin, Incomplete Freund's Adjuvant and Monophosphoryl Lipid A. *Immune Response in Skin Sensitized with Adjuvants*, 7(7): e40745.
33. Guillemain, G.J., G. Smythe, O. Takikawa and B.J. Brew, 2005. Expression of indoleamine 2, 3 dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes and neurons. *Glia*, 49(1): 15-23.
34. Carlin, J.M., E.C. Borden and G.I. Byrne, 1989. Interferon-induced indoleamine 2, 3 dioxygenase activity inhibits *Chlamydia psittaci* replication in human macrophages. *J. Interferon Res.*, 9(3): 329-337.
35. Andre, C., 2008. Etude du rôle des cytokines dans l'activation de l'indoléamine 2,3- dioxygénase cérébrale impliquée dans les altérations comportementales associées à l'inflammation. *Laboratoire de Psychoneuroimmunologie, Nutrition et Génétique*, pp: 285.
36. Schildkraut, J.J., 1965. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am. J. Psychiatry*, 122(5): 509-22.
37. Schatzberg, A.F., A.J. Rothschild, P.J. Langlais, E.D. Bird and J.O. Cole, 1985. A corticosteroid/dopamine hypothesis for psychotic depression and related states. *J. Psychiatr Res.*, 19(1): 57-42.
38. Frye, C.A. and A.A. Walf, 2009. Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. *Physiol. Behav.*, 97(2): 266-9.
39. Contreras, C.M., L. Martínez-Mota and M. Saavedra, 1998. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry*, 22(7): 1121-8.
40. Verdu, E.F., Y. Deng, P. Bercik and S.M. Collins, 2002. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*, 283(1): G27-36.
41. Estrada-Camarena, E., A. Fernández-Guasti and C. López-Rubalcava, 2006. Participation of the 5-HT1A receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 31(2): 247-55.
42. Estrada-Camarena, E., A. Fernández-Guasti and C. López-Rubalcava, 2004. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacol.*, 173: 139-45.

43. Martínez-Mota, L., J.J. Cruz Martínez, S. Márquez-Baltazar and A. Fernández-Guasti, 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 88(3): 332-40.
44. Houdeau, E., R. Moriez, M. Leveque, C. Salvador-Cartier, A. Waget, L. Leng, L. Bueno, R. Bucala and J. Fioramonti, 2007. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, 132(3): 982-993.
45. Carrier, N. and M. Kabbaj, 2012. Testosterone and imipramine have antidepressant effects in socially isolated male but not female rats. *Horm Behav.*, 61(5): 678-85.
46. Carrier, N., S.K. Saland, F. Duclot, H. He, R. Mercer and M. Kabbaj, 2015. The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biological Psychiatry*, pii: S0006-3223(15)00040-2.
47. Martínez-Mota, L., R.E. Ulloa, J. Herrera-Pérez, R. Chavira and A. Fernández-Guasti, 2011. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiology Behavior*, 104(5): 900-905.
48. Baumann, H. and J. Gauldie, 1994. The acute phase response. *Immunol Today*, 15(2): 74-80.

Publication IV

**Gender differences in the Prevalence of Depression
(Persolt Swimming Test)**

in Sciatic Nerve Injury Model Wistar Rats

Gender Differences in the Prevalence of Depression (Persolt Swimming Test) in Sciatic Nerve Injury Model Wistar Rats

*Bachir Ali Rachedi, Asma Fraia, Hacène Frih,
Moncef Zaafour, Selma Guernine and Samir Djemli*

Department of Biology, Faculty of Science,
University Badji Mokhtar, Annaba, BP 12 El Hadjar, Algeria

Abstract: Study of gender differences in the prevalence of depression (Persolt swimming test) in sciatic nerve injury model Wistar rats. A sciatic nerve ligation is performed surgically in two groups of 08 male rats and 08 female rats. The same number in males and females is considered as a control. The investigations concerning the degree of depression are obtained through the Forced Swimming Test Porsolt (FST), Plus maze test and sucrose intake. At the same time, a comparative study between the two sexes. Results: A significant increase in the level of depression is obtained resulting in male rats that had undergone ligation of the sciatic nerve. Regarding the comparison between males and females rats, some level of depression is recorded in female, while among their female depression levels are very low. This was explained by hormonal differences between the sexes. Conclusion: The sciatic nerve ligation causes depression in the rat. In the FST also we found significant differences between male and female rats to depression, suggesting the key role of sex steroids.

Key words: Depression • Sciatic nerve injury • Neuroactive forced swimming test • Gender differences steroids

INTRODUCTION

Pain is defined by IASP (International Association for the Study of Pain) as an unpleasant sensation or emotional perception, following tissue damage.

Inflammatory pain is often caused by activation of the immune system to injuries and / or other tissue infections. By strengthening sensory sensitivity after tissue injury, it promotes the recovery of the body part affected by creating an unpleasant hypersensitivity environment that discourages physical contact and motion, reducing the risk of further damage [1]. On the site of the lesion mast cells, neutrophils, macrophages, T cells and Schwann cells interact and contribute to the sensitization of nociceptors [2, 3]. Mast cells release their products rich in histamine, cytokines and proteases that will help raise awareness of nociceptors and attract other cells to the site of injury. Thus, mast cells appear to play an important role in the initiation of neuropathic pain [4]. Neutrophils will secrete cytokines (including TNF alpha) [5], Reactive Oxygen Species (ROS) and chemokines. Depletion of circulating neutrophils is signaled to prevents neuropathic pain [4]. At the same time or after

the recruitment of macrophages, T cells infiltrate the damaged nerves [2]. They are able to increase their painful hypersensitivity [6, 7]. The resident immune cells of the spinal cord and glial cells play a major role in the development of pain after peripheral nerve injury. Oligodendrocytes are closely connected with neurons, astrocytes, microglia and endothelial cells. They can respond and secrete different molecules. These cells are also susceptible to inflammation and to the elevation of glutamate (Glu) levels, observed, for example, when a lesion of the peripheral nerve. According to Echeverry *et al.* [8] in case of a lesion of a peripheral nerve, microglia undergoes changes that lead to an "on" state. These glial cells are capable, under different conditions to stimulate, produce and release a variety of effector molecules intercellular belonging to different molecular classes including pro-inflammatory molecules: cytokines, chemokines and growth factors [9, 10]. Following peripheral nerve injury, astrocyte activation results in the release of different molecules such that the extracellular glutamate concentration is increased. Indeed, the uptake of glutamate is no longer guaranteed because of the decreased expression of GLT-1 transporter by astrocytes

[11]. Moreover, astrocytes may also modulate their glutamate release [12]. Following peripheral nerve injury, there is the release of different molecules proalgesic by injured or activated cells. In addition to histamine, bradykinin, ATP, serotonin or prostaglandins, cytokines play as well at the periphery role in the spinal cord by acting directly or indirectly on the primary sensory neurons or secondary [3].

Cytokines are polypeptides mediators of immunity and inflammation. They participate in a variety of biological functions in several systems, including the CNS. The presence of inflammatory cytokines in the brain was originally assigned to an exclusive synthesis by myeloid-monocytic infiltrating cells (since the nerve cells were not supposed to produce and use these molecules). Studies on cells in culture showed TNF synthesis capacity by glial cells, astrocytes and mainly by microglia [13]. Different cytokine receptors are present in the brain or in the hypothalamus itself or in the brain structures directly connected to the hypothalamus [14]. Some of them are pro-inflammatory (TNF, IL-1 β and IL-6), others have anti-inflammatory activity, eg, IL-10. The involvement of cytokines in pain was demonstrated for the first time in 1988 [15], but as evidenced by inhibition experiments of their activity, cytokines do not participate in acute pain [16]. Proinflammatory cytokines are involved in the phenomena of hypersensitivity to pain. They act both in the periphery and centrally. Their role in the periphery has been studied in particular skin-nerve preparations [17]. The expression of these three (03) cytokines is also increased in the bone marrow [18]. Injected intrathecally, they increase the activity of neurons in the dorsal horn and induce animal painful hypersensitivity [19]. Clinical studies have also shown that there is an imbalance between cytokines pro- and anti-inflammatory drugs in patients with painful neuropathy. This imbalance would be a predisposing factor for the onset of chronic pain in cases of neuropathy [20-22].

The achenal axis (HP is sensitive to the complex action of cytokines, whether produced in the CNS or transported through the bloodstream due to the permeability of the blood-brain barrier in the hypothalamic region. IL-1, IL-6, interferon and TNF have a promoting action on this axis. The release by the adrenal glucocorticoids inhibits the inflammatory response and helps contain the immune response [23], the release of CRH, is stimulated by the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IFN alpha, but inhibited by the anti-inflammatory cytokine TGF α . The activation of the HPA axis by cytokines is also accompanied by effects on the

metabolism of certain neurotransmitters (GABA, 5HT ...) [24], as the adrenal are another site of interaction between the HPA axis and cytokines [25].

The interactions between CNS, stress and the immune system are better known, especially the role played by cytokines on the cells as well as liaison and mediation actors between the two systems [26]. Therefore, oxidative stress is associated with neuropathic pain as a result of an injury to a peripheral nerve [27]. The activation of Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate (NADPH)-oxidase (NOX) is an important intracellular source of free radicals leading to the activation of a variety of signaling events resulting in the expression of cytokines pro -inflammatory, hypertrophy, gene transcription and cell migration [28]. In cases of neuropathic pain with a lesion of a peripheral nerve, NADPH oxidase can be hyperactivated [28, 29], causing deleterious effects (damage to DNA and protein). The Nitric Oxide Synthase (NOS) are potentially involved in the maintenance of neuropathic pain [27]. In addition, a significant increase in NO levels was measured in the sciatic nerve ligated [30].

There are more than several animal models of neuropathic pain, especially in rats, mostly based on the production of a lesion of a peripheral nerve (mostly the sciatic) by physical or chemical trauma [31, 32]. This model was launched in 1988 [33].

It is in this context that fits our work, which is conducted on rats who underwent ligation of the sciatic nerve. As based on the Forced Swim Test (FST), we looked at first possible relations between ligation of the sciatic nerve and the incidence of depression and in further investigations, the possibility of a difference in the degree of depression between males and neuropathic rats females.

MATERIALS AND METHODS

Biological Material: The biological material we used in our study is Wistar rats from the Pasteur Institute of Algiers. The animals, which weigh between 200 and 250 grams, were acclimated to standard conditions of temperature and humidity. The breeding was conducted in polyethylene cages, lined with litter material of wood chips. The hygiene and prophylaxis were observed.

Parcelling Animals: Our study aims to study the incidence of depression in rats underwent ligation of the sciatic nerve and the identification of possible differences between male and female rats.

For this purpose, we defined four (04) experimental batches as follows:

- Male control (n = 08),
- Female control (n = 08),
- LIG male (n = 08),
- LIG female (n = 08).

Sciatic Nerve Ligation «Sciatic Nerve Injury»: The rat model *Ratus ratus* Wistar strain underwent ligation of the sciatic nerve while the sural nerve left intact [34]. The results lesions of hypersensitivity is marked in the lateral region of the leg that is innervated by the sural nerve was spared. The non-operated side of the rat was used as control.

The rats suffered surgery "sciatic nerve ligation" (*sciatic nerve injury*). Following this operation, the subjects received a treatment with anti-Cyclin at a dose of 0.3 ml per for five (05) days by intraperitoneal injection, after a period of complete rest for ten (10) days.

Experimental Protocol

Anesthesia:

- Rats anesthetized by intraperitoneal injection of a ketamine 0.3ml / 100g + a drop orally Largactil (chlorpromazin).
- Animals placed in a calm and quiet place until fully anesthetized.
- Verification of rats reflexes by pinching the tip of the tail and legs with a pair of tweezers to ensure the immobility of animals before any surgery.
- Shaving drapes (using an electric razor) slightly below the knee area to the hip area.
- Application of an ophthalmic ointment to the eyes of animals using a cotton swab.
- The animal was placed on its right side (or left) and placement of the left hind limb (or right) on a small platform in order to keep it high. Leg fixation with tape.
- Disinfection of the operative field with alternating scrubs of ethanol and betadine outside the surgical site.

Surgery:

- Location knee with the thumb of the left hand and use a scalpel to make an application. A few cm incision in the proximal longitudinal direction of the knee.

- Open the skin by blunt dissection using the tip of a pair of sterilized scissors.
- Separation of the muscular layer by dissection just next to the clearly visible blood vessel, close to the femur (thigh bone). The muscle layers are easily separated without bleeding, revealing the sciatic nerve right or left below the muscle.

It should be noted that in case of bleeding due to damage of a blood vessel near the knee, they must be sterilized using a cotton bud body to absorb the blood by pressing until the bleeding stops.

- Rat under a stereo microscope to gently separate the muscles with a pair of tweezers sterilized to clearly visualize the sciatic nerve.
- Identification of the area and the collateral saphenous branches of the sciatic nerve knowing that the sural nerve is the smallest of the three branches.
- Creation of a surgical tight knot around the sciatic nerve. If the first node is a member of the tight contractions will be observed.
- Cut the suture ends with a pair of micro scissors and gently closing the muscle layer. Adding a drop of lidocaine on the wound and suture with surgical knots.

Post-Surgery Period:

- Verification of the sufficiency of eye ointment.
- Rat placed in a clean cage under a paper towel in a comfortable posture to room temperature.
- Water and food are easily accessible for the animal operated.
- Intra-peritoneal injection of the antibiotic in a 0.3 ml dose for five (05) days after surgery.
- Conduct a battery of behavioral tests (neuropathic pain and anxiety and depression measures) after ten (10) days of the surgery.

Methods

Elevated Plus Maze (EPM) Test: The elevated plus maze test [35-37] is used to measure the degree of anxiety in rodents. It is composed of four arms (50 × 10cm), two open arms perpendicular to two closed arms with 40cm high walls of Plexiglas. The intersection of the four arms (central area) is a square of 10 × 10cm. The apparatus was elevated of 50 cm from the ground. The test was performed for 5 min by placing the animal in the central

area facing an open arm. Since the rat fears the empty and high spaces, his exploration of open arms shows a less anxious behavior. On the contrary, the more the animal remains in the closed arms, his behavior are known to be anxious. The 5 min sequences were recorded by a video camera to measure the following parameters: Open arms duration, closed arms duration, Open arms entries, closed arms entries and Freezing duration.

Forced Swimming Test (FST): The forced swim test [36-39] is a behavioral test of inducing despair in rats by placing the animal 15 min in a glass aquarium 54 cm height (34 × 60cm). This dimension ensures that the rat can't escape by climbing to the edges of the device. The aquarium is filled with water (26°C) to a height of 40 cm, in order to ensure that the rat will not use his legs to keep the surface and thus force him to swim. The procedure of FST in rats occurs in two phases: the pre-test and test, separated by an interval of 24 hours. During the pre-test, the rat was placed for 15 min. At the end of session, the animal is immobile. The next day, the animal plunged into the aquarium for 5 min. The swimming session on each day was videotaped for behavioral analysis. The time of immobility, swimming and climbing are calculated.

Sucrose Preference Test (SPT): All the rats were submitted to 48 h of forced exposure to 1% sucrose solution in order to habituate to it [37], during which sucrose solution was the only fluid available for consumption, followed by two days of free access to food and water. After this, the rats were submitted to water deprivation for 16 "h" prior to performing the sucrose preference test; baseline test at day zero. The sucrose preference test was performed in the rat's home cage: two pre-weighted bottles, one containing tap water and another containing 1% sucrose solution, were presented to each rat. The bottles were weighed again after 1 "h" and the weight difference was considered to be the rat intake from each bottle. The sum of water and sucrose intake was defined as total intake and the sucrose preference was expressed as the percentage of sucrose intake from the total intake following the formula: % sucrose preference= sucrose intake X100/total intake.

Statistical Analysis: Data are presented as mean ± SEM. Data were analyzed by one-way ANOVA and Newman and Keuls as the post hoc test. Results were considered significant at $p < 0.05$. Graph Pad Prism 5 for windows version 5.01 was used to do the analysis.

RESULTS

The following histograms represent the test results of forced swimming where the analysis of variance was conducted by the ANOVA1 and followed by a Newman-Keuls test, in case of significant differences between the different groups.

Forced Swimming Test:

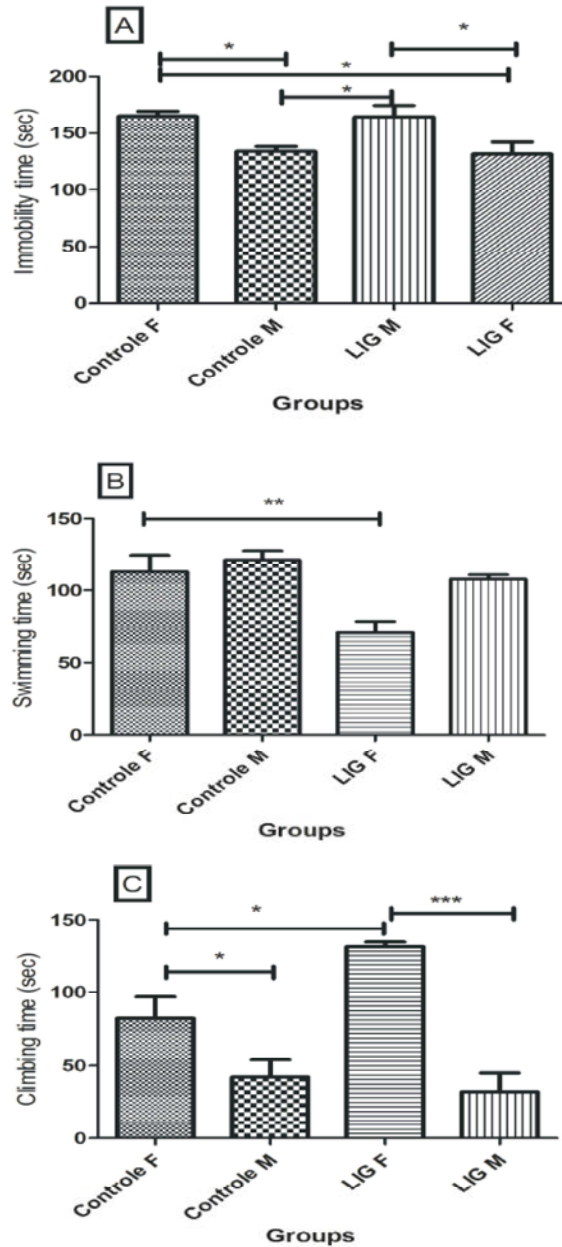


Fig. 1: Settings forced swimming in male animals and females ligated and unligated. (A: swimming time, B: immobility time, C: climbing time)

Regarding immobility time (Fig. 1B), it was observed a very highly significant ($F = 21.93$, $R \text{ square} = 0.7327$, $p < 0.0001$). The immobility time of the ligated rats was significantly higher than that of control rats (control M vs Lig M). The control rats have a significantly immobility time lower than that of control rats (control M vs control F). The immobility time is significantly reduced in rats than in controls control ligated rats (control M vs Lig F). We note further that the immobility time is higher in ligated females rats than in ligated males rats (Lig M vs Lig F).

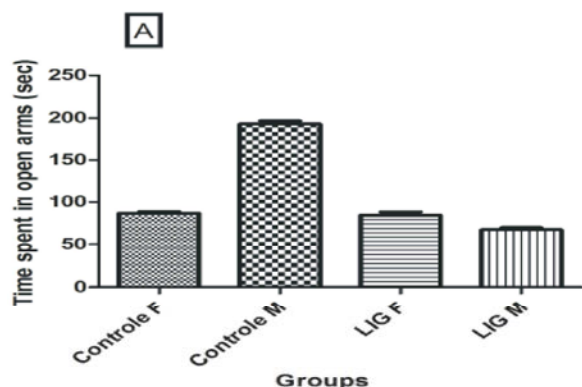
The test Newman-Keurles and revealed a significant increase in immobility time in females compared to males and before and after ligation.

As to the swimming time (Fig. 1A), the analysis of the results showed significant differences between male and female animals and that, before and after ligation. It is worth mentioning a very highly significant ($F = 33.77$; $R \text{ square} = 0.8021$, $p < 0.0001$) between the control males rats and ligated females rats (control M vs Lig F), between male animals ligated and ligated females (control M vs Lig M).

Newman-Keurles test and certify a significant increase in swimming time in males compared to females before and after ligation.

Analysis of results for the climbing time we find reveals a significant increase in climbing time (Fig. 1 C) in females compared to males. A significantly lower level ($F = 11.56$, $R \text{ square} = 0.6012$, $p < 0.0001$) is reported in rats compared to controls rats controls (control F vs control M) and female control and ligated males (control F vs Lig M). The climbing time is significantly reduced in the control rats compared to that of ligated rats (control M vs Lig F). Finally, the escalation time is significantly higher in the ligated rats compared to ligated rats (Lig F vs Lig M).

The Elevated Plus Maze (EPM) Test:



Continued

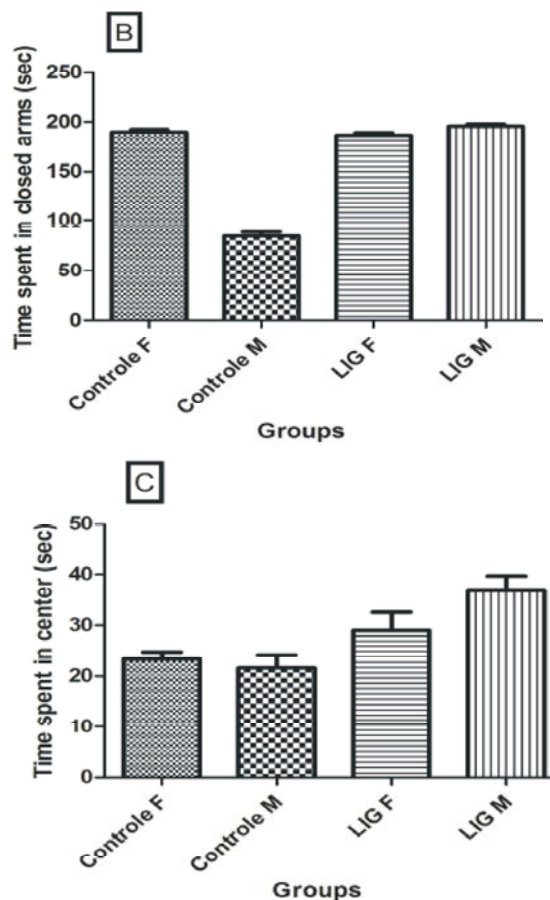


Fig. 2: Elevated Plus Maze (EPM) test parameters in male rats and female ligated and unligated (A: time spent in the open arms, B: time spent in the closed arms, C: time spent in the center of the device).

Time Spent in the Closed Arms: The ANOVA1 for time spent in the closed arms revealed a significant effect of sciatic nerve ligation ($F = 320.3$, $R \text{ Square} = 0.9717$, $p < 0.0001$).

The Newman-Keuls test watch that the level of anxiety is higher among females than among controls their male counterparts. This is revealed by the time spent in the closed arms greater in females (control M vs control M : $t = 35.40$, $p < 0.05$). The results also show that the ligation of the sciatic nerve causes an increase in the level of anxiety, as shown in the time spent in the closed arms higher in rats after sciatic nerve ligation (control M vs LIG M : $t = 37.40$, $p < 0.05$).

Time Spent in the Open Arms: The ANOVA1 for time spent in the open arms revealed a significant effect of sciatic nerve ligation ($F = 353.8$, $R \text{ Square} = 0.9743$, $p < 0.0001$).

The Newman-Keuls test was reported time spent in open arms greater in males than in controls their female counterparts (control F vs Control M : $t = 34.81, p < 0.05$). Similarly it is reported a significant decrease in the time spent in the open arms after sciatic nerve ligation (control M vs LIG M : $t = 71.18, p < 0.05$).

Time Spent in the Center: The ANOVA1 for time spent in the center revealed a significant effect of sciatic nerve ligation ($F = 6.592, R \text{ Square} = 0.4139, p < 0.0001$).

The Newman-Keuls test for time spent in the center mainly reveals a significant increase in time spent at the center after sciatic nerve ligation (control M vs LIG M: $t = 5.701, p < 0.05$).

Preference Sucrose Intake:

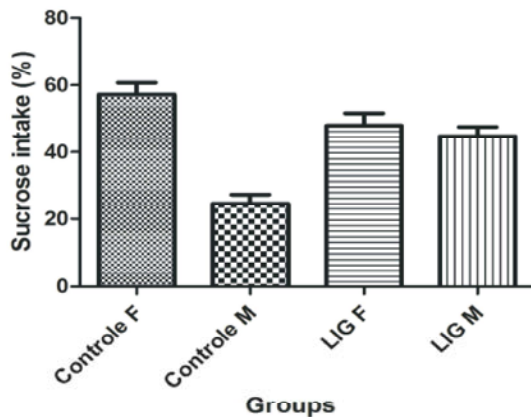


Fig. 3: Sucrose intake in rats males and females who have undergone or not the sciatic nerve ligation.

The preference for the sweet ANOVA1 revealed a significant effect of sciatic nerve ligation ($F = 18,36; R \text{ Square} = 0,6630, p < 0.0001$).

The Newman-Keuls test for preference shows that sweet consumption level is significantly lower in males than in controls their female counterparts (Control M vs Control F: $t = 10,17 ; p < 0.05$). It also appears that male rats who underwent ligation of the sciatic nerve had significantly higher sugar consumption levels (Control M vs LIG M $t = 7,275, p < 0.05$).

DISCUSSION

Our aims and objectives is to investigate the effect of the sciatic nerve ligation of the degree of depression animals. It also includes a comparative study between males and females. Our results show that in controls the degree of depression in females is more important than in males, this is revealed by the immobility assessment time

that are greater in females than in males. We attribute these variations in the degree of depression at the level of fluctuation of different sex steroids in females and males. Gender differences exist in the prevalence of depressive disorders. Some studies suggest that women respond better than men to action inhibitors of serotonin reuptake (SSRI) suggest that gonadal hormones modulate mood and drug response [40]. Significant gender differences were regularly reported because its impact on the prevalence and morbidity risk is twice as high among young adult women. The symptoms of depression are also sexual and disturbances in the circulating levels of ovarian hormones product would produce a behavioral depression [41]. In addition, behavioral changes associated with the estrous cycle, clearly showed a reduction of immobility and a higher active behaviors during proestrus [42]. From these observations, it would appear that estrogen would have a depressing effect [43]. Stocco (2008) suggest that this enzyme could be activated by various factors such as acute stress. The concentrations of estradiol in adult females and prepubertal rats could be related to the reduction of immobility and its increase observed during the test, revealing activation of the serotonin system [45]. The administration of 17β-estradiol in female or male rats increases swimming and decreases immobility in the FST. Estradiol facilitates the effect of SSRI, such as fluoxetine, the antagonist of the 5-HT1A receptor and blocks the antidepressant effect of estradiol in the FST [46, 47]. Also, it is well known that estrogens also have anti-inflammatory properties. Studies in rats and mice have demonstrated the ability of estradiol to reduce tissue damage while decreasing the expression of Th1 cytokines involved in acute inflammatory response, such as Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF), TNFα, IL-1β and IFN-γ [43, 48].

Progesterone is a sex steroid. When synthesized by the nervous system from pregnenolone [49], it seems with neurosteroid metabolites (3α-hydroxy-5α-pregnan-20-one or allopregnenolone) have an antidepressant-like effect in the swim forced [50]. It also seems to provide the body with a protective barrier in response to constantly changing environment. This protection would be through the production of neuroactive steroids such as progesterone and its metabolites. It has been shown that these products are heavily involved in the installation of anxiety [51, 52] and depression.

By cons, testosterone would anxiolytic and antidepressant effects [53, 54]. Recent reports show that in adult males, stress increases testosterone possibly by stimulating the secretion of gonadotropin.

However current data argue against this observation since the levels of this hormone are similar between the control animals and those exposed to FST.

During inflammation, the circulating cytokines suppress reproductive function by activating the secretion of hypothalamic CRH and therefore inhibiting ovarian and testicular steroidogenesis [55]. Activation of pro-inflammatory cytokines by altering neurotransmission of serotonin, is a component of the depression. But, the anti-inflammatory anti inflammatory cytokines regulate the inflammatory response by inhibiting the production and action of inflammatory cytokines [56].

In males, we note that the sciatic nerve ligation causes increased levels of depression. This is revealed in our results in increased immobility time in the ligated males. The level of depression in males ligated would be the consequence of surgery that consisted in the sciatic nerve ligation. Many studies have examined the relationship between depression and inflammation [57] and between anxiety and inflammation [58]. In addition, the limited research on the state of anxiety and inflammation gave a mixed model results. Apparently, there is a two-dimensional relationship between the CNS and the immune system. More recently, research has shown that the steroid may also bind to receptors of specific neurotransmitters and neuronal excitability change [59]. The molecules steroids that act as neuromodulators are then called neurosteroids.

Substantial evidence supports the existence of reciprocal relationships of immune regulation by the HPA axis, with a focus on the hypothalamic CRH neuron, shown as a main junction between peripheral events and the responses of the central nervous system. In this regard, if the glucocorticoid secretion is physiologically active in response to an inflammatory process, in order to prevent substantial damage to tissue of the immune response, a number of experiments indicate that other reaction mediators inflammatory / immune, including cytokines, may activate the HPA axis by the neuron hypothalamic CRH [60]. In fact, the depression has been associated with increased circulating levels of the pro-inflammatory cytokine [61].

In females, the sciatic nerve ligation does not seem to cause a remarkable difference in the level of depression in control animals. We believe in fact that ligation increases the degree of depression, however this increase was not observed in this case due to the hyperdepressive state control animals. This we have already explained by the role played by sex steroids and partly by estrogen on depressive state.

We wish to draw attention to the fact that changes of immobility time observed during the FST are inversely proportional to swim time observed. As has been reported in several studies, this means that the nerve pathway is responsible for the occurrence of depression in our study through 5HT, as reported by Albert and François in 2010. In the same vein, we argue that the activation of the 5-hydroxytryptamine (5HT), reduced the immobility by increasing swimming.

During the Forced Swim Test, antidepressants, producing a noradrenergic and dopaminergic predominant elevation reduced the immobility by increased climbing time [63].

CONCLUSION

In this study, it appears that the rats suffered sciatic nerve ligation have a higher degree of depression. This is clearly visible in male subjects, where the immobility time is higher ligated rats compared to their not ligated. We explained the occurrence of this depression by inflammation occurred following surgery. This inflammation will spark changes in the immune system with an overproduction of proinflammatory cytokines and that these would be depressinogenic as reported in several studies.

The FST also revealed a gender difference related to the state of depression. Indeed, the immobility time measured in controls female is higher than that measured at their male. This means that controls are more depressed females than males. The explanation for this difference is, in our view, to the hormonal differences between males and females. Involvement of sex steroids in the mood changes has been much documented. Thus, it has been attributed to testosterone antidepressant role. Other authors attribute, by cons, of estradiol depressinogenic effects. Another current research considers progesterone and some of its derivatives as substances with antidepressant-like effects. According to these authors, these derivatives of progesterone, such as pregnenolones are considered neuroactive steroids when they are in the brain.

REFERENCES

1. Woolf, C.J., 2010. What is this thing called pain ? J. Clin. Invest., 120: 3742-3744.
2. Marchand, F., M. Perretti and S.B.McMahon, 2005. Role of the immune system in chronic pain. Nat. Rev. Neurosci., 6(7): 521-532.

3. Moalem, G. and D.J. Tracey, 2006. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res. Rev.*, 51(2): 240-264.
4. Zuo, Y., N.M. Perkins, D.J. Tracey and C.L. Geczy, 2003. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, 105(3): 467-479.
5. Leung, L. and C.M. Cahill, 2010. TNF-alpha and neuropathic pain-a review. *J. Neuroinflammation*, 7: 27.
6. Moalem, G., K. Xu and L. Yu, 2004. T lymphocytes play a role in neuropathic pain following peripheral nerve injury in rats. *Neuroscience*, 129(3): 767-777.
7. Sommer, C. and M. Kress, 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett.*, 361: 184-187.
8. Echeverry, S., X.Q. Shi and J. Zhang, 2008. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain*, 135: 37-47.
9. Eddleston, M. and L. Mucke, 1993. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54: 15-36.
10. Yeh, T.H., Lee, Y. Da, S.M. Gianino and D.H. Gutmann, 2009. Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)- regulated glial proliferation. *Glia*, 57: 1239-1249.
11. Sung, B., G. Lim and J. Mao, 2003. Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats. *J. Neurosci*, 23: 2899-2910.
12. Araque, A., V. Parpura, R.P. Sanzgiri and P.G. Haydon, 1999. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci*, 22: 208-215.
13. Holsboer, F., 1999. Neuroendocrine studies and antidepressant drug development. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, 101: 711-716.
14. Vitkovic, L., J. Bockaert and C. Jacque, 2000. Inflammatory cytokines: neuromodulators in normal brain? *J. Neurochem*, 74(2): 457-71.
15. Ferreira, S.H., B.B. Lorenzetti, A.F. Bristow and S. Poole, 1988. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334: 698-700.
16. Ramer, M.S., E.J. Bradbury and S.B. McMahon, 2001. Nerve growth factor induces P2X₃ expression in sensory neurons. *J. Neurochem*, 77(3): 864-875.
17. Oprea, A. and M. Kress, 2000. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J. Neurosci*, 20(16): 6289-6293.
18. Winkelstein, B.A., M.D. Rutkowski, S.M. Sweitzer, J.L. Pahl and J.A. DeLeo, 2001. Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J. Comp. Neurol.*, 439(2): 127-139.
19. Reeve, A.J., S. Patel, A. Fox, K. Walker and L. Urban, 2000. Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur. J. Pain*, 4(3): 247-257.
20. Koch, A., K. Zacharowski, O. Boehm, M. Stevens, P. Lipfert, H.J. Von Giesen, A. Wolf and R. Freyhagen, 2007. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. *Inflamm. Res.*, 56(1): 32-7.
21. Uceyler, N., J.P. Rogausch, K.V. Toyka and C. Sommer, 2007. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, 69(1): 42-9.
22. Uceyler, N. and C. Sommer, 2008. Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett*, 437: 194-198.
23. Cartmell, T., G. Luheshi and N. Rothwell, 1999. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J. Physiol. (Lond)*, 518: 585-94.
24. Dunn, A., J. Wang and T. Ando, 1999. Effects of cytokines on cerebral neurotransmission. Comparison with the effects of stress. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 461: 117-27.
25. Marx, C., M. Ehrhart-Bornstein, W. Scherbaum and S. Bornstein, 1998. Regulation of adrenocortical function by cytokines-relevance for immune-endocrine interaction. *Horm. Metab. Res.*, 30(6-7): 416-20.
26. Thurin, J.M., 1996. Une vie sans soi. Clinique et interprétation des maladies psychosomatiques. *Frison Roche*, pp: 237.

27. Tanabe, M., Y. Nagatani, K. Saitoh, K. Takasu and H. Ono, 2009. Pharmacological assessments of nitric oxide synthase isoforms and downstream diversity of NO signaling in the maintenance of thermal and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury in mice. *Neuropharmacology*, 56(3): 702-708.
28. Kim, D., B. You, E.K. Jo, S.K. Han, M.I. Simon and S.J. Lee, 2010. NADPH oxidase 2- derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury induced neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(33): 14851-14856.
29. Ibi, M., K. Matsuno, D. Shiba, M. Katsuyama, K. Iwata, T. Kakehi, T. Nakagawa, K. Sango, Y. Shirai, T. Yokoyama, S. Kaneko, N. Saito and C. Yabe-Nishimura, 2008. Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain. *J. Neurosci*, 28(38): 9486-9494.
30. Naik, A.K., S.K. Tandan, Dudhgaonkar, S.P. Jadhav, S.H. Kataria, M.V.R. Prakash and D. Kumar, 2006. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur. J. Pain*, 10(7): 573-579.
31. McMahon, S.B., W.B. Cafferty and F. Marchand, 2005. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. *Exp. Neurol.*, 192: 444-462.
32. Ueda, H., 2008. Peripheral mechanisms of neuropathic pain - involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Mol. Pain*, 4: 11.
33. Bennett, G.J. and Y.K. Xie, 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33(1): 87-107.
34. Zaafour, M., A. Fraia, H. Frih, S. Guernine, S. Djemli and B. Ali Rachedi, Assessment of steroids changes (testosterone and oestradiol) after BCG inoculation in sciatic nerve injury model (male Wistar rat). *Global Veterinaria* (in press).
35. Porsolt, R.D., M. LePichon and M. Jalfre, 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*, 266(5604): 730-732.
36. Frih, H., R. Djenidi, B. Ali Rachedi, N. Frih, A. Tahraoui and M. Bairi, 2010. [Ketoconazole antagonizes the immune and gonadotropic systems in the forced swimming test in male Wistar rats]. [Article in French] Le kétoconazole antagonise les effets immuno-gonadotropes au test de la nage forcée chez le rat mâle Wistar. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 88(7): 733-744.
37. Fraia A., B. Ali Rachedi, S. Zouiche, S. Djemli and H. Frih, 2015. Polyphenon E Could Improve Negative Changes Caused by Chronic Mild Stress in Male Wistar Rats. *Global Veterinaria*, 4(4): 478-489.
38. Porsolt, R.D., G. Anton, N. Blavet and M. Jalfre, 1978. Behavioral despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur. J. Pharmacol.*, 47(4): 379-391.
39. Porsolt, R.D., A.G. Bertin, N. Blavet, M. Deniel and M. Jalfre, 1979. Immobility induced by the FST in rodents: effects of agents which modify central catecholamines and serotonergic activity. *Eur. J. Pharm.*, 57: 201-210.
40. Frye, C.A. and A.A. Walf, 2002. Changes in progesterone metabolites in the hippocampus can modulate open field and forced swim test behavior of proestrous rats. *Horm Behav*, 41(3): 306-15.
41. Frye, C.A. and A.A. Walf, 2009. Depression-like behavior of aged male and female mice is ameliorated with administration of testosterone or its metabolites. *Physiol. Behav.*, 97: 266-269.
42. Contreras, C., L. Martínez-Mota and M. Saavedra, 1998. Desipramine restricts estral cycle oscillations in swimming. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 22(7): 1121-8.
43. Verdu, E.F., Y. Deng, P. Bercik and S.M. Collins, 2002. Modulatory effects of estrogen in two murine models of experimental colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.*, 283(1): G27-36.
44. Stocco, C., 2008. Aromatase expression in the ovary: hormonal and molecular regulation. *Steroids*, 73(5): 473-87.
45. Estrada-Camarena, E., A. Fernández-Guasti and C. López-Rubalcava, 2006. Participation of the 5-HT1A receptor in the antidepressant-like effect of estrogens in the forced swimming test. *Neuropsychopharmacology*, 31: 247-55.
46. Estrada-Camarena, E., A. Fernández-Guasti and C. López-Rubalcava, 2004. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology*, 173: 139-45.
47. Martínez-Mota, L., J. Cruz Martínez, M. Márquez-Baltazar and A. Fernández-Guasti, 2008. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 88(3): 332-40.

48. Houdeau, E., R. Moriez, M. Leveque, C. Salvador-Cartier, A. Waget, L. Leng, L. Bueno, R. Bucala and J. Fioramonti, 2007. Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, 132(3): 982-993.
49. Craft, R.M., J.S. Mogil and A.M. Aloisi, 2004. Sex differences in pain and analgesia: the role of gonadal hormones. *Eur. J. Pain*, 8(5): 397-411.
50. Andrade, S., S.L. Silveira, B.D. Arbo, B.A. Batista, R. Gomez, H.M. Barros and M.F. Ribeiro, 2010. Sex-dependent antidepressant effects of lower doses of progesterone in rats. *Physiol Behav.*, 99(5): 687-90.
51. Frih, H., A. Latreche, B. Ali Rachedi, R. Djenidi, L. Sahraoui and A. Tahraoui 2012. Evolution of Elevated Plus Maze Test (Anxiety) and Porsolt Swimming Test Depression) Parameters in Wistar Female Rats Treated with Low Dose of Toluene from the 4th to 14th day of Pregnancy: Implication of Progesterone to Protect GABAergic route. *Journal of Depression and Anxiety*, 1(2): 1.
52. Neumann, I.D., A. Wigger, G. Liebisch, F. Holsboer and R. Landgraf, 1998. Increased basal activity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis during pregnancy in rats bred for high anxiety-related behaviour. *Psychoneuroendocrinology*, 23: 449-463.
53. Carrier, N. and M. Kabbaj, 2012. Testosterone and imipramine have antidepressant effects in socially isolated male but not female rats. *Horm Behav.*, 61(5): 678-85.
54. Carrier, N., S.K. Saland, F. Duclot, H. He, R. Mercer and M. Kabbaj, 2014. The Anxiolytic and Antidepressant-like Effects of Testosterone and Estrogen in Gonadectomized Male Rats. *Biological Psychiatry*, 12.024.
55. Martínez-Mota, L., R.E. Ulloa, J. Herrera-Pérez, R. Chavira and A. Fernández-Guasti, 2011. Sex and age differences in the impact of the forced swimming test on the levels of steroid hormones. *Physiology & Behavior*, 104: 900-905.
56. Baumann, H. and J. Gauldie, 1994. The acute phase response. *Immunol Today*, 15(2): 74-80.
57. Dantzer, R., J.C. O'Connor, G.G. Freund, R.W. Johnson and K.W. Kelley, 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 9(1): 46-56.
58. Kubzansky, L.D. and I. Kawachi, 2000. Going to the heart of the matter: do negative emotions cause coronary heart disease? *J. Psychosom. Res.*, 48(4-5): 323-37.
59. Rupprecht, R., 2003. Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrinology*, 28(2): 139-168.
60. Sapolsky, R.M., L.M. Romero and A.U. Munck, 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocr. Rev.*, 21(1): 55-89.
61. Zorrilla, E.P., L. Luborsky, McKay, Jr, R. Rosenthal, A. Houldin, A. Tax, R. McCorkle, D.A. Seligman and K. Schmidt, 2001. The relationship of depression and stressors to immunological assays: a meta-analytic review. *Brain Behav. Immun.*, 15(3): 199-226.
62. Albert, P.R. and B.L. François, 2010. Modifying 5-HT1A receptor gene expression as a new target for antidepressant therapy. *Front Neurosci.*, 4: 35.
63. Kawaura, K., S. Honda, F. Soeda, T. Shirasaki and K.A. Takahama, 2010. Novel antidepressant-like action of drugs possessing GIRK channel blocking action in rats. *Yakugaku Zasshi*, 130(5): 699-705.