



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université Badji Mokhtar- Annaba

جامعة باجي مختار- عنابة

Faculté des sciences

Département de biologie

THESE

Présentée en vue de l'obtention d'un Diplôme de Doctorat en Biologie
Animale

Option : Neurosciences

THEME

**CONTRIBUTION D'UN PSEUDO-STRESS GENERE SUITE AUX
CHOIX D'ADMINISTRATIONS D'UN ANTIOXYDANT NATUREL SUR
SON EFFICACITE IMMUNO-ENDOCRINE CHEZ LE RAT**

Présentée par : Mr NESSAIBIA Issam

DIRECTEUR DE THESE Pr. TAHRAOUI Abdelkrim Université d'Annaba

DEVANT LE JURY

Mr BAIRI Abdelkrim	Pr.	Président	Université d'Annaba
Mme TADJINE Aïcha	Pr.	Examinatrice	Université d'EL Tarf
Mr COUDORE François	Pr.	Examineur	Faculté de Pharmacie Châtenay-Malabry
Mr OUAKID Mohamed-Laïd	Pr.	Examineur	Université d'Annaba
Mr SOUIDI Maâmar	MCA.	Examineur	IRSN Fontenay-aux-Roses Paris

Année Universitaire 2016-2017

Remerciements

Soyons reconnaissants aux personnes qui nous donnent du bonheur ;

Elles sont les charmants jardiniers par qui nous âmes sont fleuries...

-Marcel Proust-

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.

Le seul moyen de se délivrer d'une tentation, c'est d'y céder paraît-il ! Alors j'y cédé en disant un grand Merci aux personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

Je tiens à remercier spécialement mon directeur de thèse **Professeur TAHRAOUI Abdelkrim** directeur du laboratoire de Neuroendocrinologie Appliquée, Université Badji-Mokhtar qui fut pour moi un directeur de thèse attentif et disponible malgré ses nombreuses charges. Je vous remercie d'avoir cru en mes capacités, pour le temps et la patience que vous m'avez accordés tout au long de ces années en me fournissant d'excellentes conditions logistiques. J'ai beaucoup apprécié travailler à vos côtés tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Mes sincères remerciements et ma gratitude vont aussi au **Professeur BAIRI Abdelmadjid** pour avoir accepté de présider le jury de soutenance, que vous soyez assuré de ma reconnaissance. Je lui suis très reconnaissante grandement pour l'intérêt qu'il aura porté à cette recherche.

Je remercie également **Professeur OUAKID Mohamed-Laid** d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens particulièrement à lui exprimer ma grande reconnaissance pour ces encouragements et ces précieux conseils qui m'ont tellement boosté à finaliser ce travail. Merci pour votre disponibilité. Que vous trouvez ici le témoignage de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

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

J'adresse mes remerciements à **Professeur COUDORE François** et **Docteur SOUIDI Maamar** d'avoir bien voulu évaluer ce travail et de participer au jury de ma soutenance de thèse. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma gratitude.

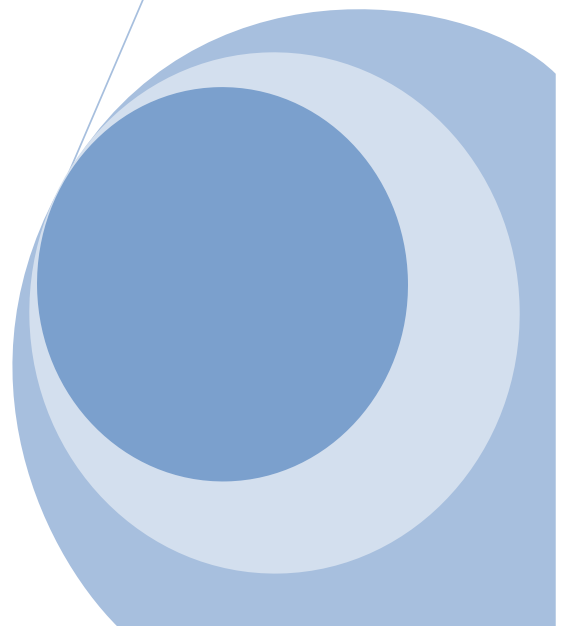
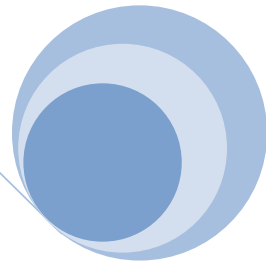
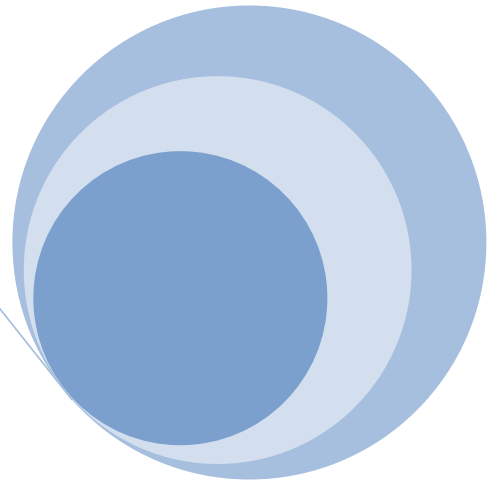
Je tiens aussi à remercier tout le personnel du laboratoire de Neuroendocrinologie Appliquée, Université Badji Mokhtar pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

Un énorme merci aux membres de l'équipe LXR : Professeur LOBACCARO Jean- Marc , FOUACHE Allan , ROUAISNEL Betty.

Je remercie également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à la réalisation de cette thèse de doctorat. Un très grand merci tout particulier à mon collègue docteur CHOUBA Ibtissem pour nos innombrables moments avec mes meilleurs souhaits de réussite pour sa vie professionnelle et personnelle.

Je tiens ensuite à remercier mes parents pour le soutien inconditionnel dont ils ont fait preuve depuis que mon projet professionnel est défini. Merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous !

RESUME



Abstract

This study was carried out on male Wistar rats has shown the importance of the non-invasive administration techniques for the treatment by hesperidin, including oral administration technique. Compared to this administration technique, a month of hesperidin injections (45 mg / kg) does not show enough preventive ability against significant immune and behavioral alterations induced by two hours of air jet in the cage of the animal identified respectively by the leukocyte formula and behavioral tests: Open field, Elevated plus-maze, Elevated T-maze and Light/Dark Box. This study suggests that unlike oral administration, the Handling and the pain associated with repeated intra-peritoneal injections cause the generation of a pseudo-stress expressed by a significant increase of the obtained plasma levels of ACTH, IL-6 and CRP shown using only injections of hesperidin vehicle NaCl 0.9% (1ml/kg). These immune-endocrine mediations triggered after such a negative contact with the animal (injections) may have side effects on the efficiency of hesperidin by slowing the anxiolytic properties.

Key words: Administration techniques, hesperidin, anxiety-like behavior, immunological disorders, IL6, ACTH.

الملخص

الدراسة التي اجريه على الجرذ الذكر ويستار بينت أهمية طرق المعالجة الغير عنيفة و التي تحوي المعالجة عن طريق الفم (البلعمة) فيما يخص الإيسبيريدين . مقارنة مع هذه الطريقة ، حقن (45مغ/كغ) من الإيسبيريدين لمدة شهر لم يظهر تقريبا أي فعالية وقائية ضد الأضرار المناعية و السلوكية الناتجة عن التعرض الى ساعتان من القذف الهوائي داخل قفص الحيوان و التي كشف وجودها الترقيم للخلايا اللمفاوية و اختبارات السلوك العصبي إن هذه المعطيات تقترح انه على عكس المعالجة عن طريق الفم أو البلعمة ,التثبيت و الألم الناتج عن الوخز المتكرر للإبر قد يكون وراء توليد قلق جانبي سلبي متجسد عند المجموعة المعالجة وهميا بالسائل المذيب الخاص بالإيسبيريدين ال NaCl بارتفاع معتبر للنسب البلازمية لل ACTH ,IL6 ,CRP . هذه التدخلات المناعية- الغدية بعد تعرض الحيوان للوخز بطريقة عنيفة و متكرر تسبب عواقب سلبية غير مرغوب فيها لأنها تبطئ من مفعول العلاجي للإيسبيريدين .

الكلمات الرئيسية: ACTH , IL6 , طرق المعالجة، الإيسبيريدين، السلوك القلبي ، اضطراب مناعي

Résumé

La présente étude réalisée sur les rats mâles de souche wistar a montré l'importance de la considération des techniques d'administrations non invasives pour le traitement d'un antioxydant (l'héspéridine) dont la technique d'administration orale. Comparé à cette voie, les injections d'héspéridine (45 mg/kg) durant 30 jours ne montrent pas assez de pouvoir préventif contre les altérations immunitaires et comportementales significatives induites par deux heures de jet air. Celles-ci sont décelées respectivement par la formule leucocytaire et les tests comportementaux : Open field, Elevated plus-maze, Elevated T-maze et Light/ Dark Box. Cette étude suggère qu'à l'inverse de l'administration orale, le Handling et la douleur liées aux injections intrapéritonéales répétées seraient derrière une génération d'un pseudo-stress exprimé par une élévation significative obtenue des taux plasmatiques d'ACTH, IL6 et de CRP suite uniquement aux injections du véhicule de l'héspéridine : le Na Cl (1ml/kg). Ces médiations immuno- endocrines déclenchées après un contact négatif avec l'animal (les injections) peuvent avoir des retombées indésirables sur l'efficacité de l'héspéridine en ralentissant ces propriétés anxiolytiques.

Mots clés : Techniques administrations, héspéridine, tests comportementaux anxieux, troubles immunologiques, IL6, CRP, ACTH.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each composed of concentric circles in different shades of blue. These circles are connected by thin, light blue lines that form a triangular shape. The top circle is the largest, the middle one is the smallest, and the bottom one is the largest again. The lines extend from the corners of the circles towards the center of the page.

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

N°	Figures	Pages
01	Les trois structures de l'axe hypothalamo-hypophysio- corticosurrénalien	3
02	Mécanisme d'activation du système immunitaire par un stress cognitif	4
03	Collaboration entre les trois systèmes lors d'un stress émotionnel	6
04	Structure chimique de l' hespéridine	14
05	Voies possibles de l'absorption intestinale de l'hespéridine et de l'hespéritine ingérés	14
06	Illustration schématique du dispositif servant au jet air stress scientifique	16
07	Illustration schématique du labyrinthe en croix surélevé	17
08	Illustration schématique du champ ouvert	18
09	Illustration schématique de la boîte claire/obscur	19
10	Illustration schématique du labyrinthe surélevé en forme de T	20
11	Illustration schématique de la méthode ELISA (sandwich)	37
12	Illustration schématique de la méthode ELISA (compétitive)	40
13	Protocole expérimental (1)	42
14	Protocole expérimental (2)	43
15	Paramètres dans l'Elevated plus-maze des rats prétraités à l'hespéridine	45
16	Paramètres dans l'Open field des rats prétraités à l'hespéridine	46
17	Paramètres dans le Light/ Dark Box des rats prétraités à l'hespéridine	47
18	Paramètres dans l'Elevated T-maze des rats prétraités à l'hespéridine	48
19	Comptage des cellules immunitaires des rats prétraités à l'hespéridine	49

N°	Figures	Pages
20a	Variation de la concentration d'ASAT, ALAT, PAL	50
20b	Variation de la concentration Triglycérides	51
20c	Variation de la concentration du cholestérol	51
20d	Variation de la concentration des protéines totales	51
20e	Variation de la concentration de la glycémie	52
21a	Variation de la concentration du TSH	52
21b	Variation de la concentration du T3 ; T4	53
22	Variation de la concentration plasmatique des anticorps	54
23a	Taux plasmatiques d'ACTH (1)	55
23b	Taux plasmatiques d'IL6	55
23c	Taux plasmatiques de CRP	56
23d	Taux plasmatiques d'ACTH (2)	56

LISTE DES TABLEAUX

N°	Titres	Pages
01	Désignation et traitement du groupe expérimental protocole (1)	12
02	Désignation de l'héspéridine	15



LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

ACTH	Corticotrophine (Adreno-Cortico-Tropic-Hormone)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
CNS	Système nerveux central (Central nervous system)
CRH	Corticolibérine (Cortico-Releasing-Hormone)
CRP	Protéine C- relatif (C-reactiveprotein)
Da	Dalton
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
ELISA	Stands for enzyme-linked immuno assay
EPM	Labyrinthe surélevé (Elevated plus-maze)
ETM	Labyrinthe surélevé en forme de T (Elevated T-Maze)
GR	Récepteur aux glucocorticoïdes
GRAN	Granulocytes
HPA	Hypothalamo-pituitaire-adrenal
I.p	Intra péritonéale
IL6	Interleukine 6

LDB	Boite claire / obscure (Light/Dark Box)
LYM	Lymphocytes
NFkB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
NK	Tueuses naturelles (Natural killer cells)
OF	Open field
pH	Le potentielhydrogène
SAA	Sérum amyloïde A
SEM	Erreur moyenne standard
TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha (TumorNecrosis Factor alpha)
W	Watt
WBC	Globules blancs

TABLE DES MATIERES

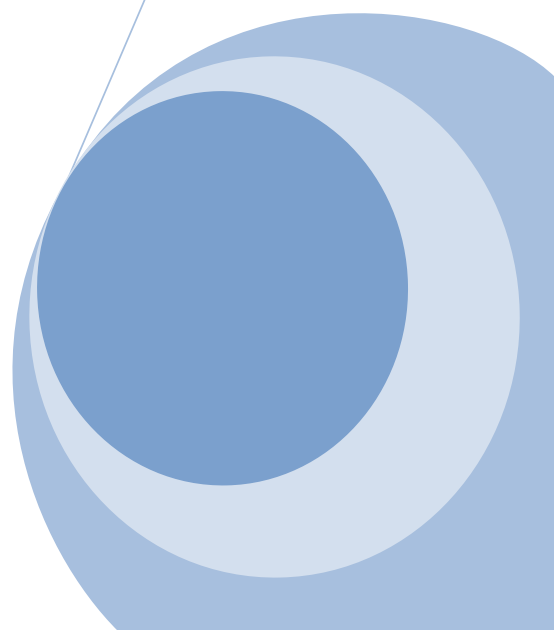
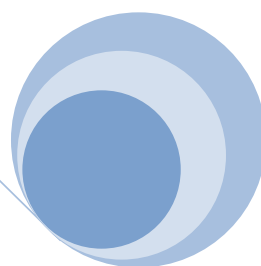
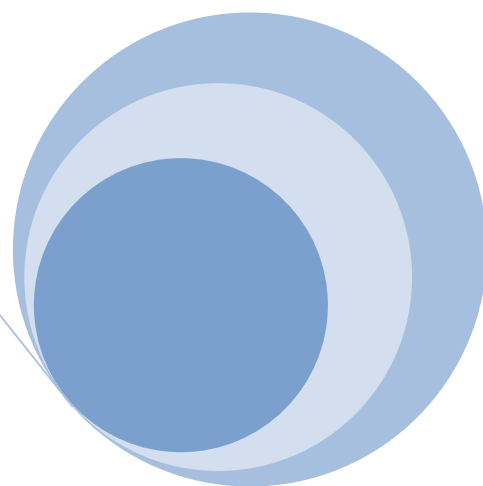


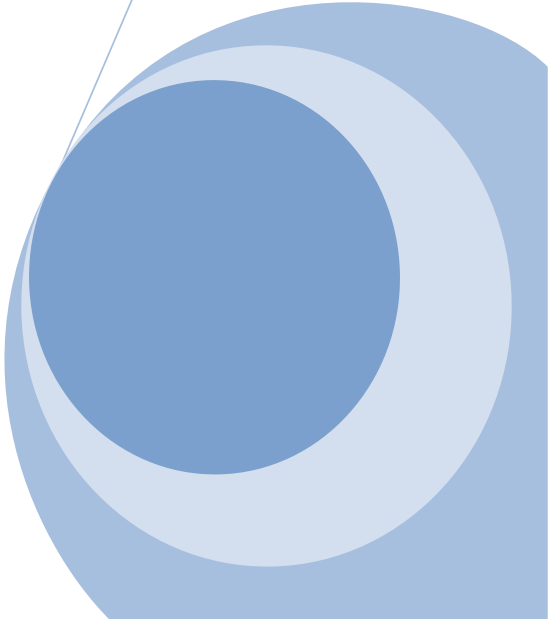
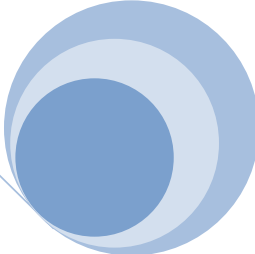
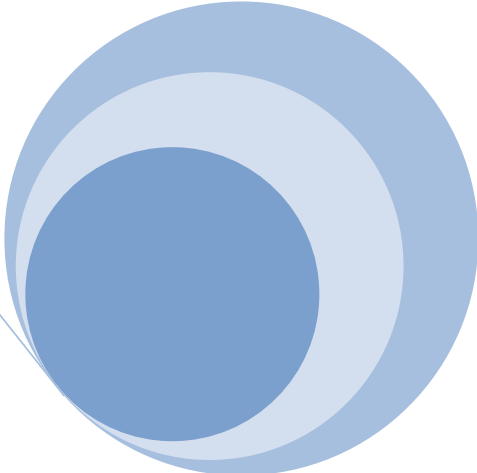
TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION	1
2. MATERIEL ET METHODES	10
2.1. Matériel biologique	10
2.1.1. <i>Animaux d'élevage</i>	10
2.1.2. <i>Conditions d'élevage</i>	10
2.2. Méthodes	11
2.2.1. <i>Traitements et groupes expérimentaux</i>	11
2.2.2. <i>Traitement par hespéridine</i>	13
2.2.3. <i>Air jet stress</i>	16
2.2.4. <i>Tests comportementaux</i>	16
2.2.4.1. <i>Test du labyrinthe en croix surélevé</i>	17
2.2.4.2. <i>Test du champ ouvert</i>	18
2.2.4.3. <i>Test de la boîte claire/obscur</i>	18
2.2.4.4. <i>Test du labyrinthe surélevé en forme de T</i>	19
2.2.5. <i>Hématologie</i>	20
2.2.6. <i>Dosage biochimique</i>	21
2.2.6.1. <i>Détermination de la glycémie</i>	21
2.2.6.2. <i>Détermination du cholestérol total</i>	22
2.2.6.3. <i>Dosage des protéines totales</i>	23
2.2.6.4. <i>Dosages des ALAT, ASAT, PAL</i>	25
2.2.6.5. <i>Détermination des triglycérides</i>	28
2.2.7. <i>Concentration plasmatique en anticorps</i>	30

TABLE DES MATIERES

2.2.8. <i>Dosages de la T3 et T4</i>	32
2.2.9. <i>Dosages de la TSH</i>	35
2.2.10. <i>Protéine C- relatif</i>	36
2.2.11. <i>Interleukine 6(IL-6)</i>	36
2.2.12. <i>Corticotrophine</i>	39
2.2.13. <i>Analyse statistique</i>	41
3. RESULTATS	45
3.1. <i>Comportement anxieux dans l' Elevated plus-maze test</i>	45
3.2. <i>Comportement anxieux dans l'Open field test</i>	46
3.3. <i>Comportement anxieux dans le Light/ Dark Box</i>	47
3.4. <i>Comportement anxieux dans l'Elevated T-maze</i>	47
3.5. <i>Comptage des cellules immunitaires</i>	48
3.6. <i>Variation des paramètres biochimiques</i>	50
3.7. <i>Variation des hormones thyroïdiennes</i>	52
3.8. <i>Variation de la concentration plasmatique des anticorps</i>	53
3.9. <i>Taux plasmatiques d'ACTH, CRP, IL6</i>	54
4. DISCUSSION	58
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	75
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	78
ANNEXES	104

INTRODUCTION



1. INTRODUCTION

L'existence phylogénique des biocénoses exigea une adaptabilité diversifiée permettant aux espèces de survivre dans les conditions environnantes. A cet égard, la survie des organismes dépend de leur susceptibilité à endurer tous les facteurs potentiellement nocifs. Ces facteurs perceptibles correspondent à un concept biologique primordial connu sous l'appellation « stress » (Nessaibia et al., 2015).

Le terme du stress est classiquement défini comme une réponse non spécifique à l'action des facteurs environnementaux sur le corps, et il est accompagné de divers changements physiologiques, émotionnels, comportementaux qui peuvent être liés à des adaptations de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) (Fernandez et al., 2010).

Chaque individu, humain et animal, est confronté dans sa vie quotidienne à des situations stressantes. Chez l'homme, le stress est omniprésent dans la vie personnelle et professionnelle. Le stress touche aussi le monde animal et représente un problème éthique et économique chez les animaux d'élevage. Une problématique importante en élevage est celle du bien-être animal. De nombreux concepts peuvent définir le bien-être, mais il se réfère principalement à l'état psychologique subjectif d'un animal en relation avec son environnement interne et externe (Rushen, 2003 ; Calvez, 2010 ; Yong et al ., 2012). De manière schématique, le bien-être animal peut se définir de trois façons différentes : l'absence de mortalité et de morbidité, l'absence de stress ou la possibilité d'exprimer les comportements naturels de l'espèce (Larrère, 2007).

Le stress induit donc une diminution du bien-être. Ainsi, une mesure classique consiste à évaluer les marqueurs physiologiques de stress (Mormede et al., 2007). Le maintien du bien-être animal est une obligation réglementaire permettant de respecter l'animal comme un être sensible mais est également d'une utilité économique car une baisse du bien-être engendre souvent une baisse de la productivité en élevage (Veissier et al., 2007). La question du bien-être animal et de l'absence de stress dans les élevages est donc fondamentale aujourd'hui.

De nombreuses études ont été effectuées afin de cerner le rôle de divers facteurs contribuant dans le développement des désordres neuropsychiatriques tels que l'anxiété et la dépression (Vyas et al., 2002 ; Yong et al., 2012). Il a été rapporté que les stressseurs émotionnels et environnementaux influencent le fonctionnement du cerveau qui sont considérés comme des facteurs clés dans la genèse des désordres neuropsychiatriques (Seyle, 1936 ; Chrousos and Gold, 1992). La manifestation du stress est souvent induite par un agresseur du monde extérieur qui va modifier un ensemble d'interactions complexes entre le système immuno - endocrinien, indispensable pour la régulation des fonctions cérébrales telles que les émotions et la cognition (Claude et al., 2002). Ceci est généralement associé à une réponse immunitaire pro-inflammatoire due à une activation de l'axe corticotrope (HPA) afin de moduler les ressources de l'organisme contre un agent qui reste non défini pour le SNC tant qu'il se présente comme un stimulus d'une intensité suffisante capable d'activer les centres de douleur ou et évoquer un traumatisme (Herbert et al., 1993 ; Besedovsky et al., 1996).

Cette préparation de l'organisme est assurée par une forte activation neuroendocrinienne. La première vague, qui survient en quelques secondes, correspond à la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par les terminaisons du système nerveux sympathique et par les glandes surrénales. Cette première réponse est responsable de l'augmentation de la pression artérielle, du rythme cardiaque et de la concentration plasmatique en acides gras libres et en glucoses. En parallèle, l'activation de l'hypothalamus par les centres supérieurs (système méso-limbique, amygdale) conduit à la sécrétion de corticolibérine (cortico-releasing hormone ou CRH) dans le système porte hypothalamo- hypophysaire (Yehuda, 2002). L'hypophyse répond à la libération de CRH par la sécrétion d'adénocorticotropine (adenocorticotropin hormone ou ACTH) (Yehuda, 2002).

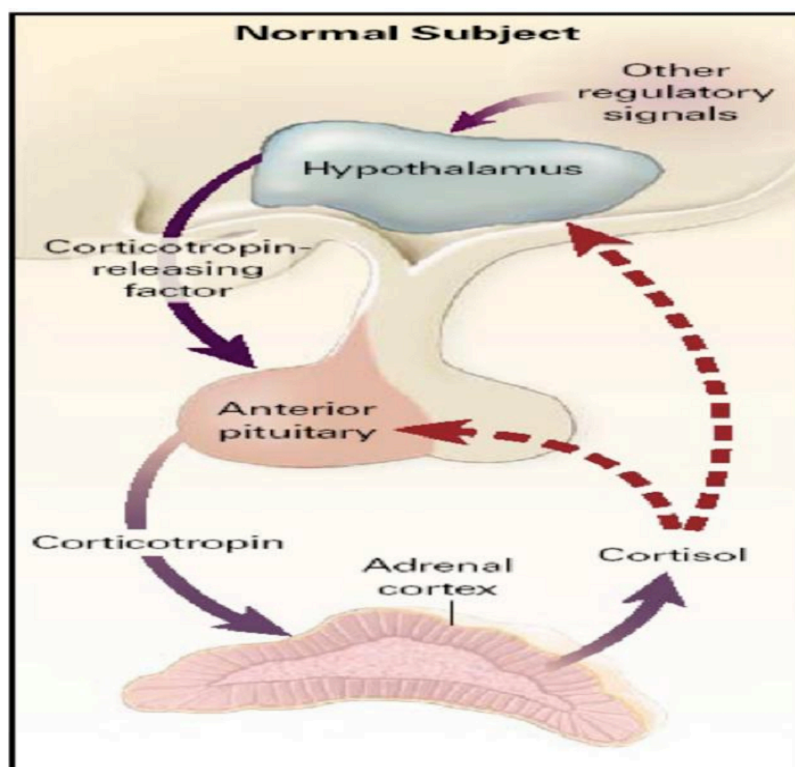


Figure 01. Les trois structures de l'axe hypothalamo-hypophysio corticosurrénalien (Yehuda, 2002).

La réponse neuroendocrinienne permet de mettre le système immunitaire en état d'alerte. En effet, les cellules immunitaires disposent de récepteurs pour bon nombres des acteurs neuroendocriniens cités ci-dessus. Les récepteurs des glucocorticoïdes, de la prolactine, de l'hormone de croissance, de l'œstradiol ou de la testostérone sont exprimés par les cellules immunitaires. En général, les glucocorticoïdes, les androgènes, la progestérone et l'ACTH dépriment les fonctions immunitaires, alors que la GH, la prolactine, la thyroxine et l'insuline les stimulant (Dorshkind and Horseman, 2001).

Le système immunitaire intègre aussi des informations nerveuses : les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et secondaires (rate et ganglions) sont sous le contrôle des terminaisons nerveuses sympathiques et cholinergiques. Les leucocytes expriment des récepteurs pour de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides: récepteurs α -adrénergiques, récepteurs aux endorphines, aux enképhalines, à la substance P, à la somatostatine et au peptide vaso-intestinal (Blalock, 1989).

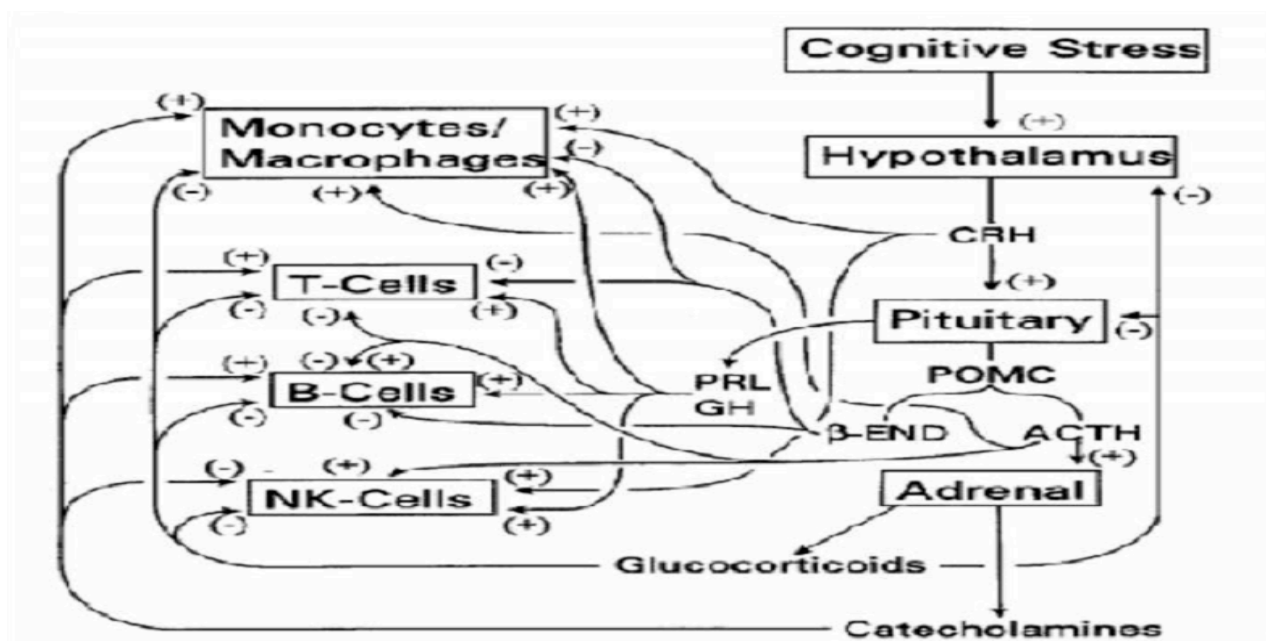


Figure 02. Mécanisme d'activation du système immunitaire par un stress cognitif (Blalok, 1984).

En plus les glucocorticoïdes sont connus pour leur activité anti-inflammatoire et immuno-modulatrice (Munck et al., 1984). Lors d'une réponse inflammatoire, ils inhibent la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et les lymphocytes T, ils aident à réguler la réponse de fièvre et favorisent la production des protéines de la phase aiguë par le foie. Ils inhibent aussi la prolifération des lymphocytes T, diminuent l'activité bactéricide des macrophages et suppriment l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (NK)(Munck et al., 1984; Wilckens and De Rijk, 1997). Le stress peut également par l'intermédiaire des glucocorticoïdes inhiber la fonction de présentation de l'antigène en diminuant l'expression des molécules du CMH II par les macrophages et par les cellules dendritiques (Hosoi et al., 1998 ; Zwillling et al., 1990).

En particulier, la capacité de l'IFN- γ à induire l'expression des molécules du CMH II par les macrophages péritonéaux est décruée chez les animaux stressés (Zwillling et al., 1992). Simultanément, la CPA présente d'autres molécules membranaires qui constituent des signaux de co-stimulation nécessaires à une présentation efficace de l'antigène. Les glucocorticoïdes inhibent aussi l'expression des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques (Moser et al., 1995).Cependant, les glucocorticoïdes peuvent aussi exercer des propriétés immunostimulantes sur les lymphocytes B (Wilckens and De Rijk, 1997). Ils favorisent la recirculation des cellules immunitaires (Dhabhar et al., 1995). Le système sympathique exerce également un contrôle sur le trafic des cellules immunitaires, notamment en favorisant la libération de chémokines qui attirent les neutrophiles sur le lieu de l'inflammation (Elenkov et al., 2000).

Les catécholamines orientent la différenciation des cellules T, modulent la prolifération lymphocytaire, l'activité bactéricide des macrophages et l'activité cytotoxique des NK (Elenkov et al., 2000).

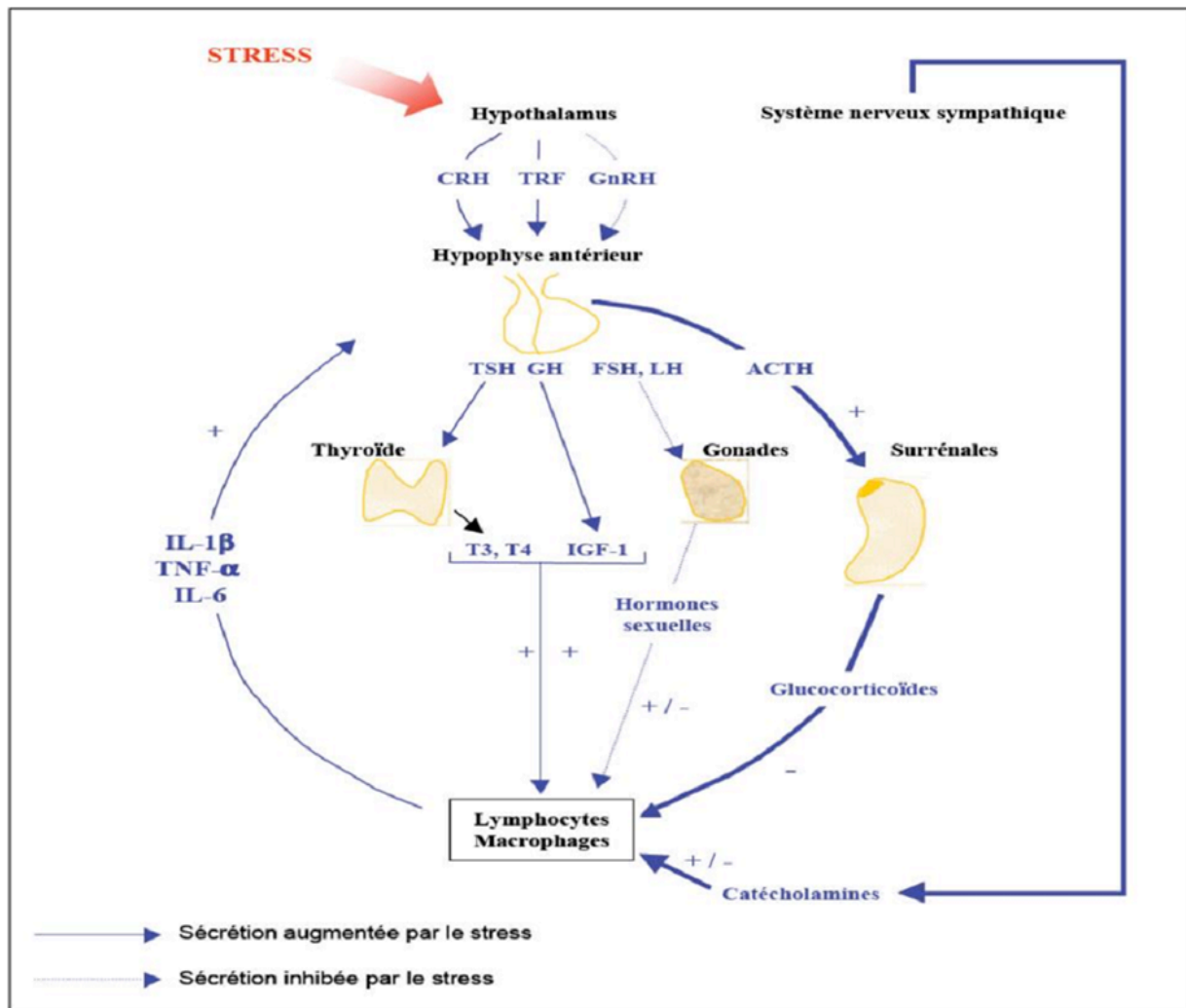


Figure 03. Collaboration entre les trois systèmes lors d'un stress émotionnel (Merlot, 2003).

Elles peuvent jouer un rôle tantôt immunostimulant, tantôt immunosuppresseur. Globalement, les conséquences du stress sur l'immunité semblent variables et parfois contradictoires. Ces contradictions peuvent parfois venir du fait que la notion du stress est beaucoup trop large et recouvre des situations extrêmement

diverses. Le caractère potentiellement stressant d'un stimulus résulte de plusieurs facteurs. Il dépend de la nature de ce stress, mais aussi de la capacité de l'organisme à répondre de façon adaptée à ce stress. Cette aptitude dépend vraisemblablement de caractéristiques stables de l'animal (sa réactivité émotionnelle, la façon dont il perçoit et interprète les stimuli environnementaux) et de caractéristiques transitoires, liées à l'état de sensibilisation de l'organisme au moment où survient le stress (Merlot, 2003). Le traitement des animaux de laboratoires au cours d'une expérimentation peut être considéré comme un stress, en conséquence déclencher une réponse neuroendocrine non désirable chez ces animaux. Cela de même pour le traitement par les antioxydants naturels couramment utilisés comme l'héspéridine. Malgré qu'elle représente que ce soit par administration orale ou par injection intra-péritonéale une voie importante pour diminuer les troubles métaboliques et l'abondance des radicaux libres à cause du mode d'action d'hormones de stress et des cytokines sur l'oxydation des cellules cibles (Hirata et al 2005; Garg et al., 2001).

Mais le pseudo – stress infligé à la fois par le Handling de l'animal et la douleur des narcoses répétées de l'aiguille associée à cette dernière peut probablement interférer en diminuant la capacité du médicament à corriger le statut physiologique et comportemental de l'animal. Ces avancées ont été tirées à partir de nombreuses critiques de la définition classique du placebo (Mavissakalian, 1987; Coryell and Noyes, 1988) étant une substance inactive sans le moindre effet pharmacologique montrant ainsi l'importance de la considération de la technique d'administration elle-même, surtout en ce qui concerne l'expérimentation sur les rongeurs où l'environnement social externe est un facteur clé lors de l'approche avec ces animaux (Drago et al., 2001 ; Sonja et al ., 2005).

En effet l'expérience sociale est liée directement avec le processus inflammatoire (Bartolomucci, 2007 ; LeMay et al., 1990; Takaki et al., 1994). Chez la souris et le rat, un stress social incluant les injections est capable d'altérer les fonctionnements du système immunitaire en provoquant une augmentation des taux des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF- α ...) et aboutissent vers une résistance aux glucocorticoïdes (Kinsey et al., 2008; Powell et al., 2009 ; Takaki et al., 1994). En conséquence, probablement compromettre la qualité des résultats obtenus sur la numérotation sanguine et les tests comportementaux visant à démontrer l'efficacité de l'héspéridine lors d'un protocole expérimental quelconque à cause d'une négligence de l'impact du choix de la technique d'administration sur l'état anxieux du modèle animal utilisé. Dans le but de clarifier et de produire le même contexte expérimental sur le rat de souche Wistar, utilisant ainsi deux techniques d'administrations différentes (l'injection intra-péritonéale et l'administration orale) avec une même dose d'héspéridine dans deux expérimentations séparées ont été réalisées:

- La première partie consiste à étudier le comportement ambulateur et anxieux des rats sous l'air jet stress, à travers la réalisation d'un ensemble de tests largement répondus (*l'Open Field, l'Elevated plus-maze, le Light/Dark Box et l'Elevated T-maze*), à savoir le profil hématologique des cellules immunitaires avant et après traitement par l'antioxydant (l'héspéridine).
- La deuxième partie permet de mettre en évidence la réponse immuno-endocrine liée à la technique d'administration elle-même, aux manipulations expérimentales en appliquant respectivement (l'injection intra-péritonéale et l'administration orale) du véhicule approprié (Na Cl 0,9% ; 1ml/Kg) pendant un mois poursuivie par un dosage d'ACTH, IL6, CRP plasmatiques.

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes and two thin blue lines. The circles are arranged in a triangular pattern, with the largest circle at the top right, a smaller one in the middle, and another large one at the bottom right. The lines intersect to form a triangular frame around the circles. The text 'MATERIEL ET METHODES' is centered on the left side of the page.

**MATERIEL ET
METHODES**

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Animaux d'élevage

Le matériel biologique de base que nous avons choisi est le rat blanc mâle adulte *Rattus rattus* de la souche Wistar, provenant de l'institut Pasteur d'Alger. Ces rats sont des mammifères nocturnes de l'ordre des rongeurs. Leur puberté survient entre 50 et 60 jours après la naissance chez les deux sexes, la descente des testicules se produit bien avant la puberté, habituellement autour de l'âge de sevrage. Un rat en santé peut vivre entre 02 ans et demi à 03 ans dépendant de la souche, du sexe, des conditions environnementales et d'autres variables (Baker et al., 1980). A leur arrivée, ces rats pesaient entre 140 et 160 grammes, et au début de l'expérimentation, ils pesaient en moyenne 200 ± 20 grammes.

2.1.2. Conditions d'élevage

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

2.2. Méthodes

2.2.1. Traitements et groupes expérimentaux

Deux expériences ont été menées pour la réalisation de cette étude avec différents groupes de rats.

- *Expérimentation 1*

Quarante rats ont été divisés en quatre groupes (n=10). Le groupe T désigne les témoins. Le groupe GH quant à lui subit un entraînement pendant une semaine avec 2 ml de solution sucrée 5% directement de la seringue. Les animaux s'adaptent vite à cette procédure ce qui permettra le passage à l'administration orale de l'hésperidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) à raison 45 mg/kg trois fois par jour. Même fréquence et dose ont été attribuées au groupe IH par voie d'injection intra-péritonéale (i.p). La durée du traitement par l'antioxydant est de un mois avant l'application de l'air jet stress simultanément avec le groupe S stressé le j 30.

Cette manière de traiter est basée sur les parcours récents dans le domaine de la psycho-traumatologie qui explore des méthodes permettant de prévenir les troubles anxieux avant même que leurs apparitions font lieux (Reno et al., 2008). A la fin de la séance de 2h du air jet stress, le comportement des quatre groupes des animaux ont été testés dans plus-maze (EPM), open field (OF), light/dark box (LDB), elevated T-maze (ETM), ensuite sacrifier par décapitation, sous anesthésiant mild-di-ethyl-ether. La collecte du sang est faite dans des tubes ethylene-diaminetetraaceticacid (EDTA)-coated pour la réalisation de la formule lymphocytaire et biochimique, le dosage TSH, T3 et T4.

- **Expérimentation 2**

Trente rats répartis en trois groupes (n=10). Comme dans l'expérimentation précédente, le groupe T servira de témoin et le groupe G est adapté avec l'administration orale directe à l'aide de la solution sucrée 5% puis traité momentanément avec le groupe IP pendant la durée d'un mois (3 fois /jour) par le véhicule de l'héspéridine Na Cl 0.9 % (1ml/kg) ou placebo, par voie d'administration orale et injection intra-péritonéale pour le groupe IP. Le j 30 de l'expérimentation, les animaux après anesthésie ont été décapités pour l'obtention du sérum préparé immédiatement par centrifugation à 3,000×g pendant 15 min. Le surnageant est utilisé pour la mesure des taux d'ACTH, IL6, CRP.

Tableau01. Désignation et traitement du groupe expérimental (Protocole 1)

Désignation du groupe (n=10)	Traitement
T (témoin)	Rats non stressés non prétraités
G (control gavage)	Rats non stressés prétraités par voie orale au véhicule (Na Cl 0.9 %)
IP (control injection)	Rats non stressés prétraités par voie intra-péritonéale au véhicule (Na Cl 0.9 %)
IH (injection héspéridine + air jet stress)	Rats non stressés prétraités par voie intra-péritonéale à l'héspéridine
GH (gavage héspéridine+ air jet stress)	Rats non stressés prétraités par voie orale à l'héspéridine
S (air jet stress)	Rats stressés

- ***Expérimentation 3***

Trente rats répartis en trois groupes (n=10). Le groupe témoin et le groupe Natural administration ont subis une semaine d'entraînement recevant 2 ml de solution sucrée à 5%, puis traités temporairement avec le groupe gavage pendant une période de 4 semaines avec le véhicule NaCl 0,9% (1 ml / kg) par administration directe et gavage en utilisant une aiguille sèche pour le groupe gavage. Les rats ont été ensuite sacrifiés par décapitation sous éther-diéthylique et la collecte du sang a été effectuée dans des tubes (EDTA). Le sang a été centrifugé pendant 15 minutes à 3000 tr / min pour un dosage d'ACTH et d'anticorps plasmatiques (modèle 5810R, Eppendorf, Allemagne).

2.2.2. Traitement par un antioxydant (l'héspéridine)

- ***Présentation de l'héspéridine***

L'héspéridine (Sigma-Aldrich, Germany ; Fig.04) est un flavanone glycosylé (glycoside) constitué d'un flavanone appelé héspéritine et d'un disaccharide nommé rutinose. C'est une substance solide peu hydrosoluble. Elle est cependant plus hydrosoluble que son aglycone, l'héspéritine. Sa formule moléculaire est $C_{28}H_{34}O_{15}$ et son poids moléculaire est de 610,57 Da. Son disaccharide, le rutinose, est composé de glucose et de rhamnose (6-désoxy-L-mannose) (Park et al., 2008).

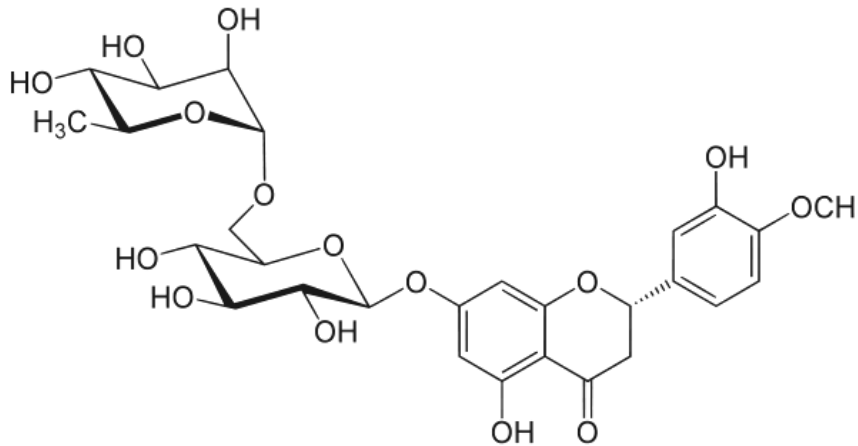


Figure 04. Structure chimique de l'hespéridine (Park et al., 2008).

La pharmacocinétique de l'hespéridine est mal connue, son absorption par l'épithélium intestinal sous forme de glycoside n'a pas été confirmée. La génine (aglycone) correspondante, hespéridine, est détectée dans le sérum après son ingestion et pourrait être formée avant ou l'absorption dont elle pourrait subir une glucuronidation soit au niveau de la paroi intestinale soit dans le foie (Nielsen et al., 2006).

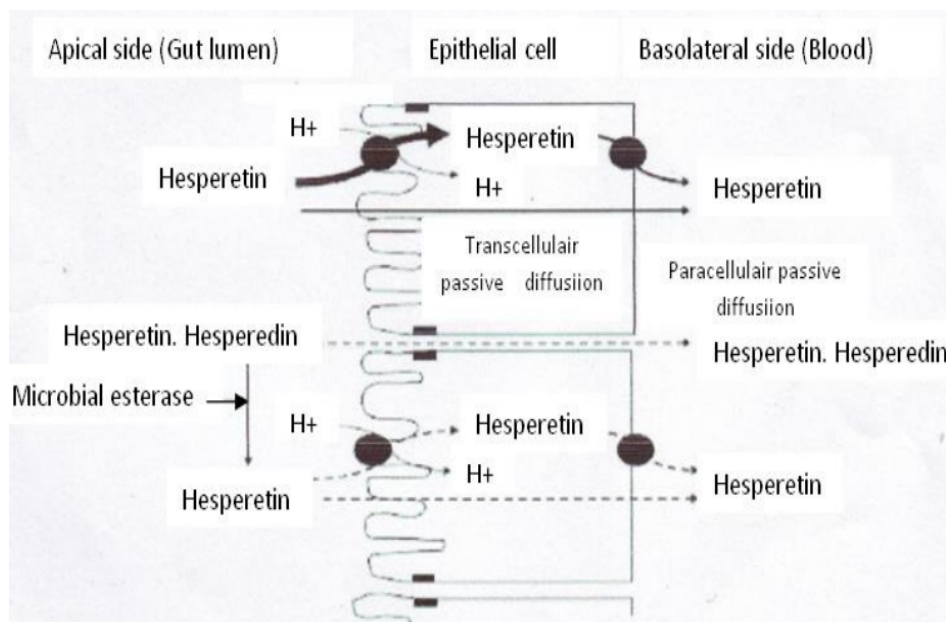


Figure 05. Voies possibles de l'absorption intestinale de l'hespéridine et de l'hespéridine ingérés (Nielsen et al., 2006).

• **Administration de l'héspéridine**

L'antioxydant choisi pour traiter les rats (l'héspéridine) se trouve sous forme de poudre jaunâtre. Pour préparer la dose adéquate on utilise une balance de précision afin de mesurer en fonction des poids des rats 45 mg d'héspéridine pour 1kg de rats. Les doses quantifiées sont ajoutées dans des tubes à Eppendorf pour être dissous avec 1 ml de véhicule par 1kg de rats, avant l'administration il faut bien agiter les tubes jusqu'à l'obtention d'une solution blanche semi aqueuse.

Tableau02. Désignation de l'héspéridine (Park et al., 2008).

Nom	Héspéridine
Source	Sigma, St. Louis, MO, USA
Synonym	Hesperetin 7-rhamnoglucoside, Hesperitin-7-rutinoside
Empirical Formula	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
Molecular Weight	610.56
Biochem/physiol Actions	Flavonoid phytochemical extracted from citrus species. It is the rhamnoglucoside (rutinoside) of hesperetin

Au cours de cette expérimentation, l'héspéridine a été dissoute dans un sérum physiologique NaCl 0,9% puis administrée aux lots GH et IH par gavage et injection intra-péritonéale à raison de 45mg /kg de poids corporel /jour pendant trente jours consécutifs. Cette administration a été adoptée par des études ayant démontré son efficacité sur les rats (Wasowski et al., 2012).

2.2.3. Air jet stress

L'air jet stress choisi d'après de nombreux travaux scientifiques (Lundin et al., 1984 ; Julien et al., 1988 ; DiBona and Jones, 1995 ; Zhang et al., 1996 ; Barrès et al., 2004 ; Kanbar et al., 2007a) est un stress à la fois émotionnel et physique provoqué en envoyant un jet air d'une pression constante de 1 bar à l'aide d'un compresseur muni d'un manomètre dans la cage du rat à travers un orifice latéral. La procédure de l'air jet stress a été effectuée au 30^{ème} jour du protocole pendant une durée de 2 heures, pendant lesquelles le rat a été mis dans une cage en plexiglas (28 x 9 x 14 cm) (Fig.06). La cage est dotée de plusieurs trous pour permettre la ventilation et le renvoi d'une pression condensé de l'air. Les rats qui n'ont pas subis le stress ont été placés dans un dispositif identique à celui utilisé pour les sessions de stress. Après chaque session, le rat a été retourné dans sa cage d'élevage et le dispositif essuyé par une solution d'éthanol 70%.

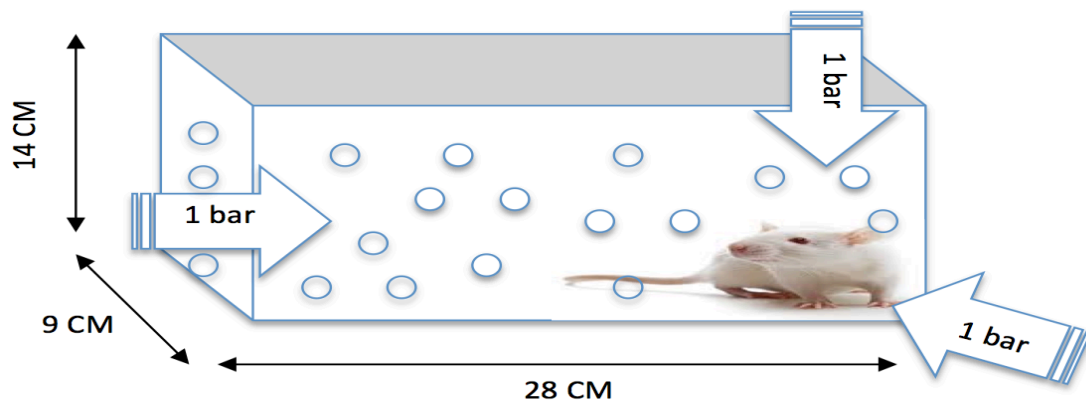


Figure 06. Illustration schématique du dispositif servant au jet air stress scientifique (Lundin et al., 1982).

2.2.4. Tests comportementaux

Le comportement anxieux inné est une composante fondamentale du comportement général des rongeurs. Il se manifeste par l'attitude de l'animal à avoir peur lorsqu'il est mis, sans expérience préalable, dans un environnement non protégé.

Ce comportement peut être évalué à l'aide de dispositifs expérimentaux validés dont les plus utilisés sont le labyrinthe en croix surélevé (EPM), le champ ouvert (OF), la boîte claire/obscur (LDB) et un test d'attention, d'apprentissage et de mémorisation, le labyrinthe surélevé en forme de T (ETM).

2.2.4.1. Test du labyrinthe en croix surélevé (*Elevated plus-maze test; EPM*)

Le dispositif consiste en labyrinthe croisé avec deux bras ouverts (50×10 cm) et deux bras fermés ($50 \times 10 \times 45$ cm). L'appareil se situe à une hauteur de 50 cm au-dessus du sol (Patin et al., 2005). La chambre où le test était effectué est éclairée par une lampe électrique de 60-W suspendue à 175 cm de la zone centrale du labyrinthe (Estanislau and Morato, 2005). Chaque rat est placé individuellement au centre du dispositif orienté vers l'un des deux bras ouverts et son exploration libre est mesurée pendant 5 min à l'aide du logiciel EhtoLog 2.2 TM (Ottoni et al., 2000). L'expérience exploite le conflit chez les rongeurs, entre la peur des espaces ouverts et le désir d'explorer un nouvel environnement (Pellow et al., 1985). Les paramètres mesurés dans ce test sont : le temps passé dans les bras ouverts, le temps passé dans les bras fermés. A la fin de chaque session, le dispositif est essuyé à l'éthanol 70 % pour éviter le transfert des signaux olfactifs entre les animaux.

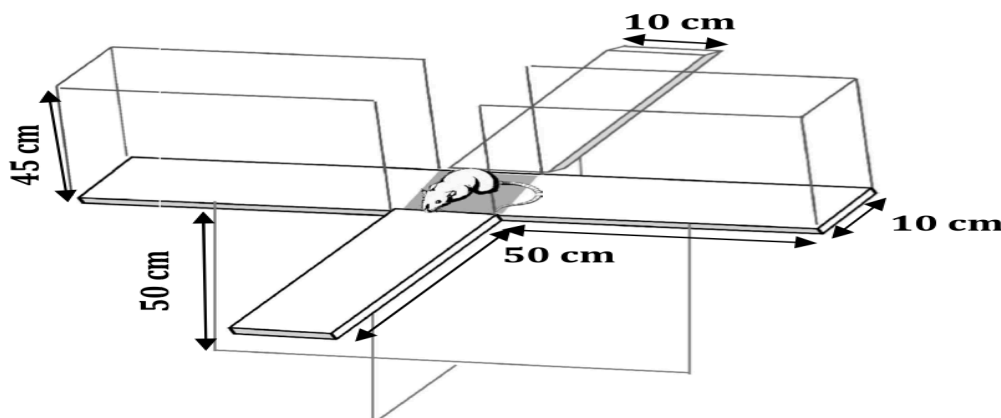


Figure 07. Illustration schématique du labyrinthe en croix surélevé (Patin et al., 2005).

2.2.4.2. Test du champ ouvert (*Open field; OF*)

Le test du champ ouvert est considéré comme un atout fondamental pour la mesure de l'activité locomotrice exploratrice spontanée chez les rongeurs tout en reflétant la peur caractéristique de ces animaux face à des espaces ouverts (Angrini et al., 1998). Les dimensions de ce test ont été retenus d'après les travaux (Sáenz et al., 2006), comme étant une plateforme cubique en plexiglas (70 cm × 70 cm × 40 cm) divisée en zone centrale (35 cm²) et périphérique pour que l'expérimentateur peut mesurer le temps passé dans chaque zone pendant une session de 5 min réalisée semi automatiquement par le logiciel EhtoLog 2.2TM (Ottoni et al., 2000) tout en assurant à chaque fois l'élimination des odeurs en essayant avec l'éthanol 70 %.

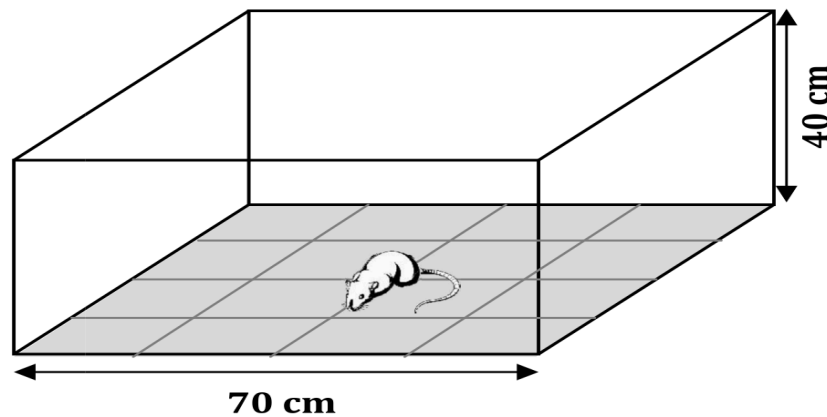


Figure 08. Illustration schématique du champ ouvert (Hall, 1934).

2.2.4.3. Test de la boîte claire/obscur (Light/ Dark Box; LDB)

De nombreux paradigmes comportementaux basés sur différentes situations conflictuelles, interactions sociales ou explorations de nouveaux environnements ont été proposés pour modéliser l'anxiété animale. B. Costall et al ont décrit (Pharmacol. Biochem. Behav. 32 (3): 777-785, 1989).

Un nouveau modèle s'appuyant sur les propriétés aversives d'un open field et sur la comparaison des activités exploratoires dans un compartiment illuminé et dans un compartiment sombre sous influence de substances anxiolytiques (Arrant et al., 2013). Pour la réalisation de ce test, le dispositif de l'open field après avoir été divisé, le plancher en deux compartiments : un d'eux (compartiment obscur) a été peint en noir et l'autre laissé transparent et éclairé par une lampe blanche brillante. Une ouverture jouant un rôle d'une porte a été créée entre les deux compartiments (10 cm × 10cm). Au début du test, le rat est placé dans le compartiment clair et ses activités comportementales sont enregistrées pendant 5 min et calculées par le logiciel EhtoLog 2.2 TM (Ottoni et al., 2000).

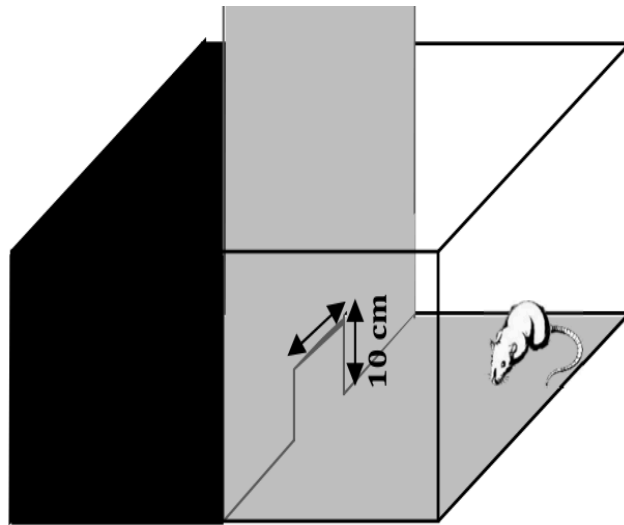


Figure 09. Illustration schématique de la boîte claire/obscur (Estanislau et Morato, 2005).

2.2.4.4. Test du labyrinthe surélevé en forme de T (Elevated T-maze; ETM)

Ce test est appliqué pour déterminer les désordres anxieux chez les rongeurs suivant leur comportement d'échappement (Gobira et al., 2013). Le dispositif est

préparé suite à une obstruction de l'un des bras fermé de l'Elevated plus-maze test avec une barrière cartonnée (12 cm×40 cm) (Estanislau et Morato, 2005). Chaque rat est placé dans l'extrémité distale de l'un des deux bras ouverts et le temps (latence) qu'il prend à s'échapper vers le bras fermé a été mesuré en trois sessions consécutives (Echappement 1, Echappement 2, Echappement 3) à 30 secondes d'intervalles. Un maximum de 300 secondes a été désigné pour toutes les sessions, indiquant la fin de la session si l'animal ne montre aucun comportement d'échappement. Après chaque session, le rat est retourné à sa cage et le dispositif est essuyé avec de l'éthanol 70 %.

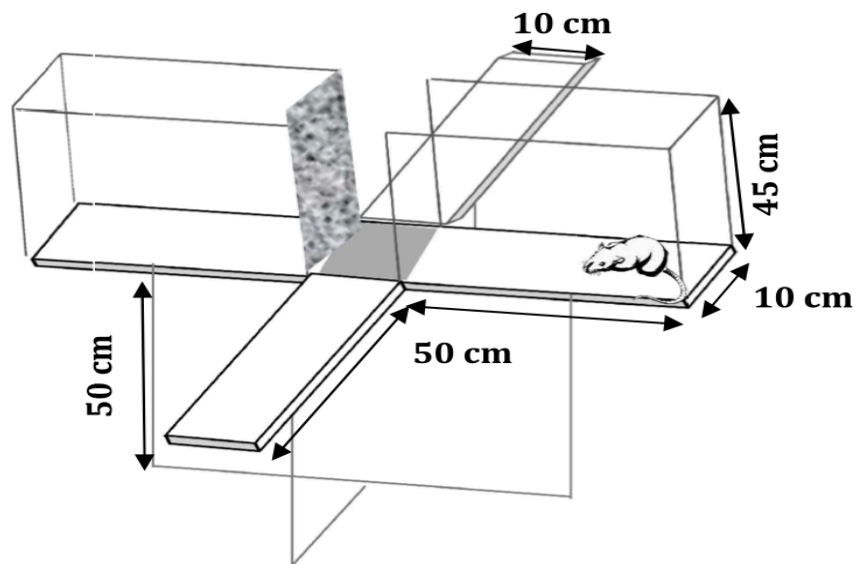


Figure 10. Illustration schématique du labyrinthe surélevé en forme de T (Estanislau et Morato, 2005).

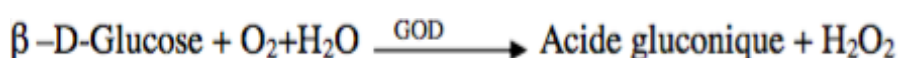
2.2.5. Hématologie

Les paramètres hématologiques (WBC - Globules blancs, LYM - Lymphocytes, MONO - Monocytes, GRAN – Granulocytes) ont été mesurés à l'aide d'un automate d'hématologie (PCE-210 model 2009, Japan).

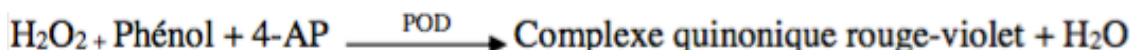
2.2.6. Dosages biochimiques

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

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



L'hydrogène peroxydase ainsi formé en H₂O₂ est détecté par le phénol et 4-aminophenazone (4-AP) à la présence de la peroxydase pour donner enfin un complexe coloré quantifiable par spectrophotométrie.



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

Réactifs

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

Procédure

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

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

Calcul

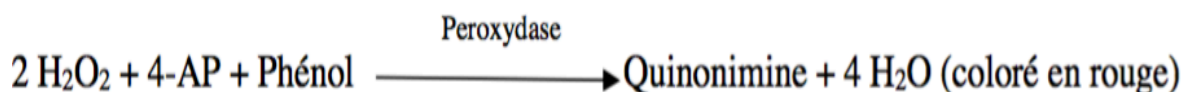
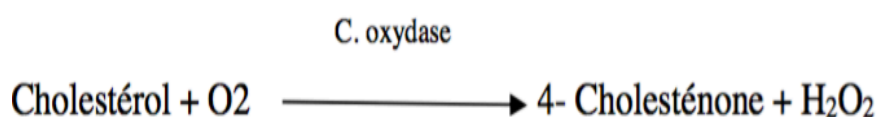
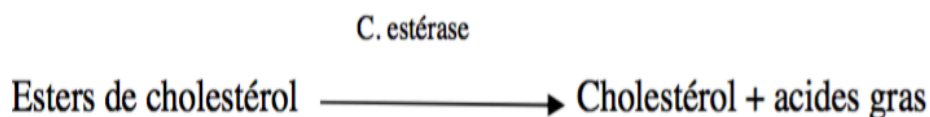
Abs. = Absorbance

Abs.(Patient)/Abs. (Étalon)x Concentration étalon (100mg/dl) = glucose (mg/dl)

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

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

Principe



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

Réactifs

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

Procédure

Dissoudre le contenu de réactif 2 (enzymes) dans un flacon de réactif 1 (tampon). Mélanger et incuber pendant 10 min à la température ambiante. Lire l'absorbance de l'échantillon et de l'étalon à 505 nm contre le blanc.

Calcul

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

2.2.6.3. Dosage des protéines totales : selon la fiche technique Spinreact. (Burtis et al., 1999)

Principe

Les protéines forment un complexe coloré en bleu violet intensif avec les ions de cuivre dans un milieu alcalin. L'iode est inclus comme un antioxydant. L'intensité de la couleur formée est proportionnelle à la concentration des protéines totales dans l'échantillon.

Réactifs

Réactif 1 :	Sodium potassium tartrate	15 mmol/l.
Biuret	Sodium iodique	100 mmol/l.
	Potassium iodique	
	Sulfate de cuivre (II)	5 mmol/l.
Etalon	Sérum albumine bovin	7 g/dl

Echantillon : Plasma

Mode opératoire

	Blanc	Etalon	Echantillon
Réactif de travail (ml)	1.0	1.0	1.0
Etalon (µl)	--	25	--
Echantillon (µl)	--	--	25

Mélanger, incuber pendant 5 min à 37°C, ou 15-20 min à une température ambiante. Lire les absorbances des échantillons et de l'étalon contre le blanc réactif à 540 nm. La coloration finale est stable au moins 30 minutes.

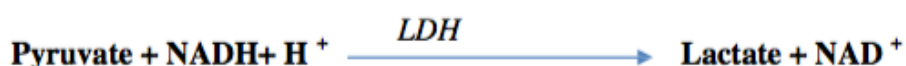
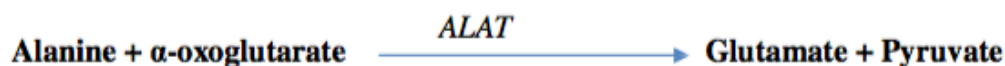
Calcul de la concentration

$$\text{Protéine totale (g/dl)} = \frac{(A) \text{ Echantillon}}{(A) \text{ Etalon}} \times \text{Concentration de l'étalon (7g/dl)}$$

2.2.6.4. Dosage des transaminases et de la phosphatase alcaline

2.2.6.4.1. Dosage d'alanine aminotransférase (ALAT/TGP)

Selon la fiche technique *Biomaghreb* (bergmeyer, 1978 ; Bergmeyer, 1980)



La diminution de la concentration en NADH est directement proportionnelle à l'activité enzymatique d'alanine aminotransférase dans l'échantillon.

Réactifs 1:	Tampon Tris pH 7.5	100 mmol/l
Tampon	Tampon L- alanine	500 mmol/l
Réactif 2 :	NADH	0.18 mmol/L
Substrat	Lactate déhydrogenase (LDH)	1200 U/L
	oxoglutarate	15 mmol/l

Réactif de travail

Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

Echantillon : Plasma

Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1.0
Echantillon (µl)	100

Mélanger, incuber pendant une minute à température ambiante et lire l'absorbance initiale à 340 nm. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minute (Δ Abs/min).

Calcul de la concentration

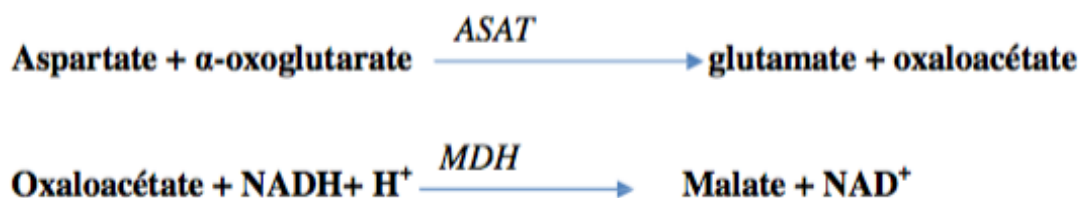
$$\text{ALAT (U/L)} = \Delta A / \text{min} \times 1750$$

2.2.6.4.2. Dosage de l'aspartate aminotransférase (ASAT/TGO)

Selon la fiche technique biomaghreb (Bergmyer et al, 1976 ; Bergmeyer et Wahiegeld, 1978).

Principe

L'aspartate aminotransférase (AST) appelée aussi L'oxaloacétate de glutamate (GOT) catalyse le transfert réversible d'un groupe aminé à partir de l'aspartate au α -cétoglutarate formant le glutamate et l'oxaloacétate. L'oxaloacétate est réduit au malate par la malate déshydrogénase (MDH) et le NADH, H^+ .



Réactifs

Réactif 1 : tampon	Tris pH 7.8	80 mmol/l.
	L- aspartate	200 mmol/l.
Réactif 2 : Substrat	NADH	0.18 mmol/L.
	Lactate déshydrogenase (LDH)	800 U/L.
	Malate déshydrogenase (MDH)	600U/l.
	α -oxoglutarate	12 mmol/L

Réactif de travail

Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

Echantillon : Plasma

Mode opératoire

Réactif de travail (ml)	1
Echantillon (µl)	100

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 340 l'absorbance initiale et démarrer le Chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes.

Calcul de la concentration

$$ASAT (U/L) = \Delta A/min \times 1750$$

2.2.6.4.3. Dosage de la phosphatase alcaline (PAL)

Selon la fiche technique *Biomaghreb* (Houssamen *et al.*, 1977)

Principe

La phosphatase alcaline catalyse l'hydrolyse de p-nitrophényl phosphate à pH 10.4 pour donner le p-nitrophénol et le phosphate selon la réaction suivante :



La formation de p-nitrophénol est mesurée photométriquement, où elle est proportionnelle à l'activité catalytique de la phosphatase alcaline dans l'échantillon.

Réactifs

Réactif 1 : Tampon	Diethanolamine (DEA) pH 10.4	1 mmol/l
Réactif 2 : substrat	nitrophényl phosphate (pNPP)	10 mmol/L

Réactif de travail

Dissoudre une tablette de réactif 2 (substrat) dans le tampon (réactif 1).

Echantillon : Plasma

Mode opératoire

Réactif de travail	1.0
Echantillon (µl)	20

Mélanger, incuber pendant une minute. Lire à 405 l'absorbance initiale et démarrer le chronomètre simultanément. Lire à nouveau après 1, 2 et 3 minutes. Déterminer la moyenne des absorbances par minute (Δ Abs/min) pour l'utiliser dans les calculs.

Calcul de la concentration

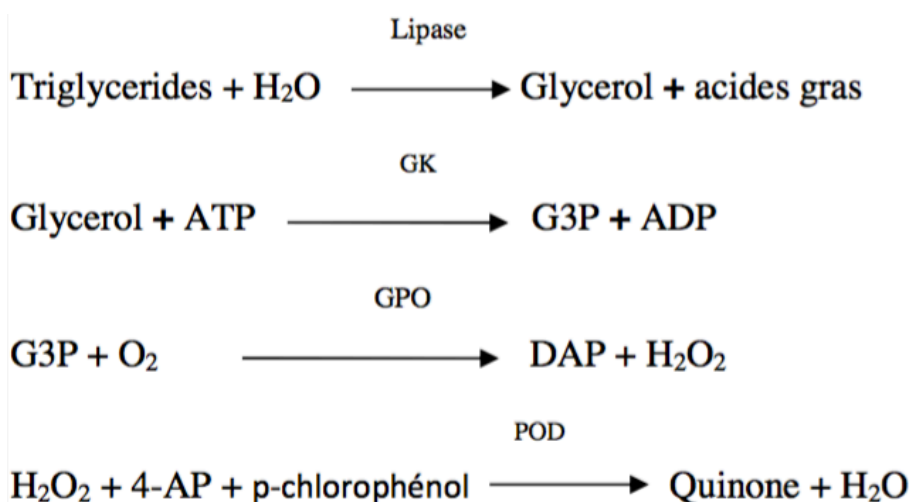
$$PAL (U/L) = \Delta A/min \times 3300$$

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

L'incubation des triglycérides de l'échantillon avec la lipoprotéinlipase (LPL) libère le glycérol et des acides gras. Le glycérol est convertit en glycérol-3-phosphate (G3P) et adénosine diphosphate (ADP) par le glycérol kinase et l'ATP. Le glycérol-3-phosphate (G3P) est ensuite convertit par le glycérol

phosphate déshydrogénase (GPO) en dihydroxyacétone phosphate (DAP) et peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Dans la réaction finale, le peroxyde d'hydrogène réagit avec 4-aminpphénazone (4- AP) et le p-chlorophénol en présence de peroxydase (POD) pour donner de la quinone complexe coloré en rouge.

Principe



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

Réactifs

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

Procédure

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

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

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

Calcul

Abs. = Absorbance

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

2.2.7. Etude de la concentration plasmatique en anticorps

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

Principe

Il est basé sur la détermination au point final de la concentration d'IgG, IgA, IgE, IgM par la mesure photométrique d'une réaction antigène-anticorps entre les anticorps présents dans l'échantillon. L'addition de polyéthylène glycol permet d'atteindre rapidement le point final, augmente la sensibilité et diminue le risque d'obtention de résultats faussement négatifs pour les échantillons présentant un excès d'antigène.

La détermination de l'immunoglobuline G , M, A et E dans le sérum ou le plasma doit être recueillie soit dans des tubes héparinés ou EDTA. La mesure se fait à l'aide d'un lecteur OLYMPUS sur une longueur d'onde 570nm, et muni d'un logiciel informatique qui calcule automatiquement la gamme étalon et nous donne directement la valeur à l'unité désirée en utilisant les réactifs suivant :

R1 tampon TRIS : 100mmol/l, pH 7,5 NaCl : 150mmol/l ; Polyéthylène glycol conservateur stabilisant.

R2 tampon TRIS : 100mmol/l, pH 8.0 anti-IgG, IgA, IgE, IgM : dépend du titre de l'anti sérum NaCl : 300mmol/l ; conservateur anticorps

Procédure

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

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

Calcul

$\Delta A = (\Delta 2 - \Delta 1)$ échantillon / calibran

2.2.8. Dosages de la T3 et T4 (LARSEN, 1972)

Principe

Une quantité fixe de T3 ou de T4 marqué à l'iode 125 entre en compétition avec la T3, T4 à mesurer dans l'échantillon ou dans le calibrateur pour une quantité donnée de sites d'anticorps anti-T3 et anti-T4, liés aux anticorps de chèvre anti-souris immobilisés sur la paroi d'un tube en polystyrène. Après une heure d'incubation à température ambiante, l'étape d'aspiration met fin à la réaction de compétition. Les tubes sont alors lavés avec 2 ml de solution de lavage de travail et à nouveau aspirés. Une courbe de calibration est tracée et la concentration de T3, T4 des échantillons est mesurée par interpolation des doses à partir de la courbe de calibration.

Résumé du protocole

	COMPTAGE TOTAL μl	CALIBRA- TEURS μl	TÉMOINS POUR LES ÉCHANTILLONS μl
Calibrateurs (0 à 5) Échantillons, Témoins	—	50	—
Traceur	200	200	200
Anti-T3, Anti-T4	—	100	100
Incubation	1 heure à température ambiante en agitant constamment		
Séparation Solution de lavage de travail : Séparation	—	Aspirer (ou décanter) 2,0 ml Aspirer (ou décanter)	
Comptage	Compter les tubes pendant 60 secondes		

Préparation des réactifs

- A. Calibrateurs** : Reconstituer le calibrateur zéro et les autres calibrateurs avec 0,5 ml d'eau distillée.

B. Témoins : Reconstituer les témoins avec 0,5 ml d'eau distillée.

C. Anti-T3 ; Anti-T4 : Reconstituer l'anti-T3 et l'anti-T4 avec 11 ml d'eau distillée.

D. Solution de lavage de travail : Préparer un volume approprié de solution de lavage de travail en ajoutant 69 volumes d'eau distillée à 1 volume de Solution de lavage concentrée (70 x). Utiliser un agitateur magnétique pour homogénéiser la solution. Éliminer toute solution de lavage de travail à la fin de la journée.

Recueil et préparation des spécimens

- Les échantillons de sérum doivent être conservés à 2–8 °C. - Si le test n'est pas démarré dans un délai de 24 h, il est recommandé de les conserver à –20 °C.
- Éviter tout cycle ultérieur de congélation-décongélation.

Procédure

- Étiqueter les tubes avec revêtement en duplicata pour chaque calibrateur, témoin ou échantillon. Pour le comptage total, étiqueter deux tubes sans revêtement.
- Mélanger brièvement sur vortex les calibrateurs, les témoins et les échantillons et dispenser 50 µl de chaque dans leurs tubes respectifs.
- Dispenser 200 µl de T3 et de T4 marqué à l'iode 125 dans chaque tube, y compris les tubes sans revêtement pour le comptage total.
- Dispenser 100 µl d'anti-T3 et d'anti-T4 dans chaque tube, excepté les tubes destinés au comptage total.
- Agiter doucement le portoir de tubes avec la main pour libérer les éventuelles bulles d'air piégées.
- Incuber 1 heure à température ambiante en agitant constamment.

- Aspirer (ou décanté) le contenu de chaque tube (excepté les tubes de comptage total). S'assurer que la pointe en plastique de l'aspirateur atteint le fond du tube à revêtement afin de bien prélever tout le liquide.
- Laver les tubes avec 2 ml de solution de lavage de travail (excepté les tubes de comptage total) et aspirer (ou décanté). Eviter de générer de la mousse pendant l'ajout de la solution de lavage de travail.
- Laisser les tubes reposer en position verticale pendant deux minutes puis aspirer la goutte de liquide rémanente.
- Procéder au comptage des tubes pendant 60 secondes dans un compteur gamma.

Limite de détection

Vingt calibrateurs zéro ont été testés en parallèle avec un ensemble d'autres calibrateurs. La limite de détection, définie comme étant la concentration apparente de deux écarts types en dessous de la valeur moyenne de comptage pour une liaison nulle, était de 0,1nmol/l.

Spécificité

Le pourcentage de réaction croisée estimé par comparaison de la concentration générant une inhibition de 50% est respectivement :

Composé	Réactivité croisée (%)
L-3,3',5-triiodothyronine (L-T3)	100
3,3',5'-triiodothyronine (rT3)	ND
L-thyroxine (L-T4)	0,17
D-thyroxine (D-T4)	0,04
Acide 3,3',5-triiodothyroacétique (TRIAC)	52
3,5-diiodo-L-tyrosine	0,22

ND = non détectable

Calcul des résultats

- Calculer la moyenne des mesures effectuées en duplicata.
- Calculer la radioactivité liée en pourcentage de la liaison mesurée au point calibrateur zéro (0) selon la formule suivante :

$$B/B0 (\%) = \frac{\text{Comptage (Calibrateur ou Échantillon)}}{\text{Comptage (Calibrateur Zéro)}} \times 100$$

- Avec un papier 3 cycles semi-logarithmique ou logit-log, tracer les valeurs (B/B0 (%)) de chaque point calibrateur en fonction de la concentration de T3 de chaque point calibrateur. Rejeter toute valeur hors norme évidente.
- Il est également possible d'utiliser des méthodes assistées par ordinateur pour générer une courbe de calibration. Si le traitement des résultats est automatisé, il est recommandé d'utiliser une fonction logistique à 4 paramètres pour l'ajustement de la courbe.
- Il est également possible d'utiliser des méthodes assistées par ordinateur pour générer une courbe de calibration. Si le traitement des résultats est automatisé, il est recommandé d'utiliser une fonction logistique à 4 paramètres pour l'ajustement de la courbe.
- Pour chaque analyse, le pourcentage de traceur total lié en l'absence de T3 non marqué (B0/T) doit être vérifié.

2.2.9. Dosages de la TSH (LARSEN, 1972)

Principe et technique

Principe de compétition - Durée totale du cycle analytique : 27 minutes

- 1ère incubation : 50 µL d'un échantillon de sérum sont incubés avec une solution tampon de prétraitement (PT1) et un tampon réactif de prétraitement (PT2) consistant en un immunocomplexe préformé de récepteur TSH porcine

solubilisé (pTSHR), et un anticorps monoclonal de souris anti-récepteur TSH porcin biotinylé.

- 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/ProCell M. Une différence de potentiel appliquée à l'électrode déclenche la production de luminescence qui est mesurée par un photomultiplicateur.
- Les résultats sont obtenus à l'aide d'une courbe de calibration. Celle-ci est générée, pour l'analyseur utilisé, par une calibration en 2 points et une courbe de référence mémorisée dans le code-barres du réactif.

2.2.10. Protéine C-relatif (CRP)

Le taux de CRP dans le sérum a été mesuré par la méthode néphélométrie en utilisant MININEPHTM en accord avec le protocole de la manufacture (ZK044. L. R, The Binding Site Ltd, Birmingham, U.K.). L'intervalle de mesure est entre 3,51-12 mg/l pour un échantillon 1/40 de dilution. La sensibilité a été de 0,44 mg/l quant à la dilution 1/5 de l'échantillon a été utilisé.

2.2.11. Interleukine 6(IL-6) (Hirano et al., 1988)

La concentration d'IL-6 a été mesuré par la méthode immuno-enzymatique ELISA type "sandwich" (kit : EK0412, Boster Biological Technology Ltd, USA). Toutes les mesures ont été prises comme elles ont été décrites dans le protocole fourni par le fabricant. Les densités optiques ont été lues à 450 nm et la concentration des échantillons a été calculée à partir de la courbe étalon en pg / ml d'IL-6. La dose minimale détectable (limite inférieure de détection) et le niveau de détection de l'IL-6 étaient typiquement inférieures à 5 pg / ml et de 62,5 à 4000 pg / ml, respectivement.

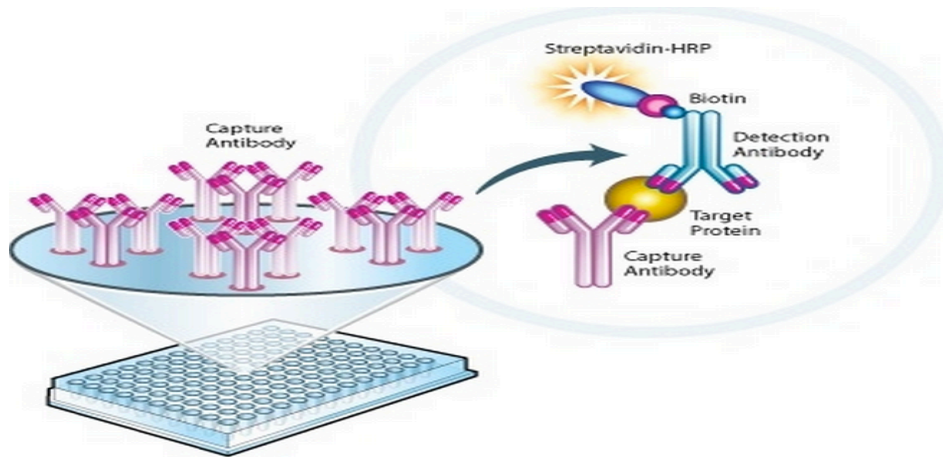
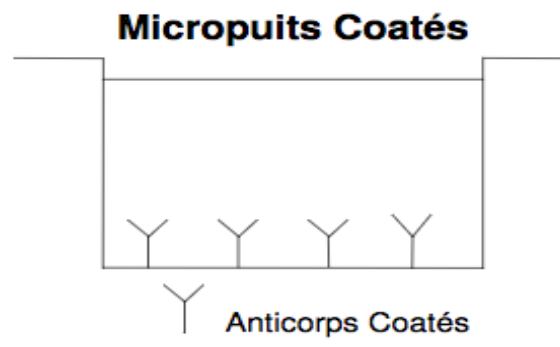


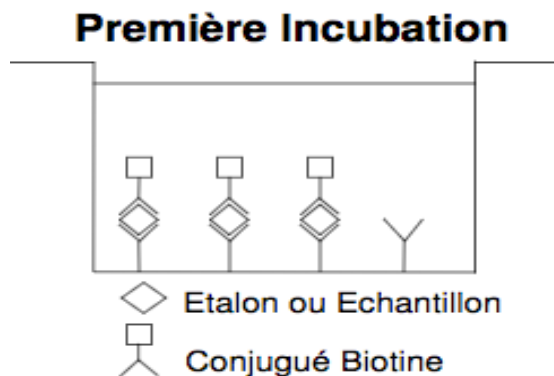
Figure 11. Illustration schématique de la méthode ELISA (sandwich)
(Goldsby et al., 2003).

Principe du Test

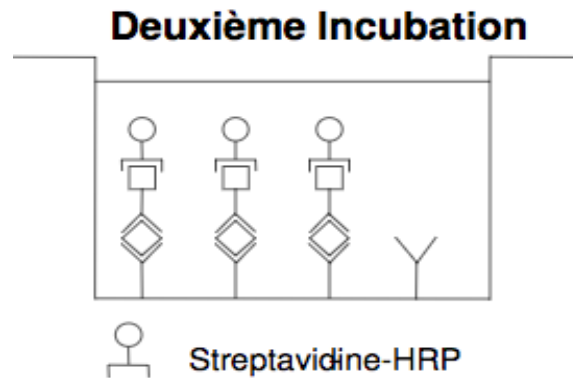
Un anticorps anti-IL-6 est adsorbé sur des micro-puits.



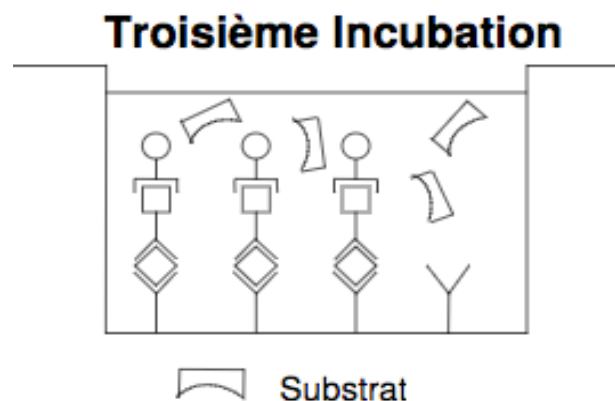
L'IL-6 présente dans l'échantillon ou l'étalon se lie aux anticorps adsorbés dans les puits, un anticorps monoclonal anti-IL-6 conjugué à la biotine est ajouté et se lie à l'IL-6 capturé par le premier anticorps.



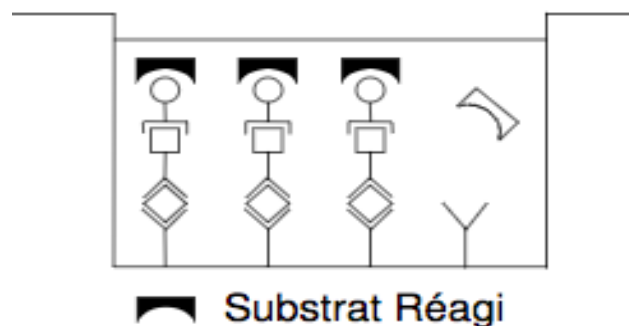
Après l'incubation, le conjugué non lié est retiré au cours d'une étape de lavage. De la streptavidine-HRP est ajoutée et se lie au conjugué de biotine anti-IL-6.



Après l'incubation, la streptavidine-HRP non fixée est éliminée au cours d'une étape de lavage, et la solution substrat réactive à la HRP est ajoutée aux puits.

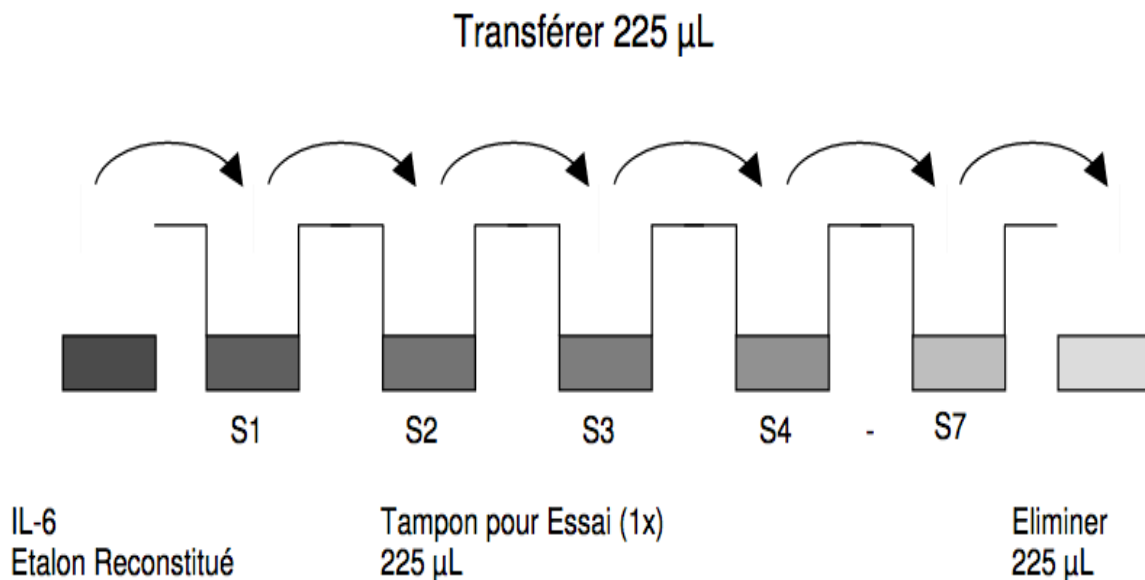


Un produit coloré est formé en proportion à la quantité d'IL-6 présente dans l'échantillon. La réaction est arrêtée par addition d'acide et l'absorbance est mesurée à 450 nm. Une courbe étalon est préparée à partir de sept dilutions d'étalon IL-6 et la concentration de l'échantillon IL-6 dosage.



Dilution externe des étalons

Etiqueter les 7 tubes, un pour chaque point d'étalon. S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7. Puis préparer les séries de dilutions 1:2 pour la courbe d'étalonnage de manière suivante: Pipeter 225 µl de tampon pour un essai (1x) dans chaque tube. Pipeter 225 µl d'étalon reconstitué (concentration = 200 pg/ml) dans le premier tube marqué S1 et agiter (concentration d'étalon 1 = 100 pg/ml). Pipeter 225 µl de cette dilution dans le deuxième tube marqué S2, et mélanger soigneusement avant le transfert suivant. Répéter des séries de dilutions 5 fois pour créer les dilutions d'étalon pour la courbe d'étalonnage. Tampon pour essai (1x) sert comme blanc.



2.2.12. Corticotrophine (ACTH)

Pour mesurer les concentrations plasmatiques de l'hormone de l'ACTH, le test ELISA "compétitive" immuno-enzymatique sur phase solide (ELISA) basé sur le principe de compétition. La quantité inconnue d'antigènes présents dans l'échantillon et une quantité fixe d'antigènes conjugués à une enzyme entrent en compétition pour les sites de fixation des anticorps coatés dans les puits. Après incubation, les puits sont lavés pour arrêter la réaction de compétition.

L'intensité de la couleur développée suivant la réaction substrat est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon. Les résultats des échantillons peuvent être déterminés directement à partir de la courbe étalon a été réalisé selon les directives des fabricants. Le kit pour le dosage de l'ACTH a été obtenu à partir de Phoenix Pharmaceuticals Inc. Burlingame, USA.

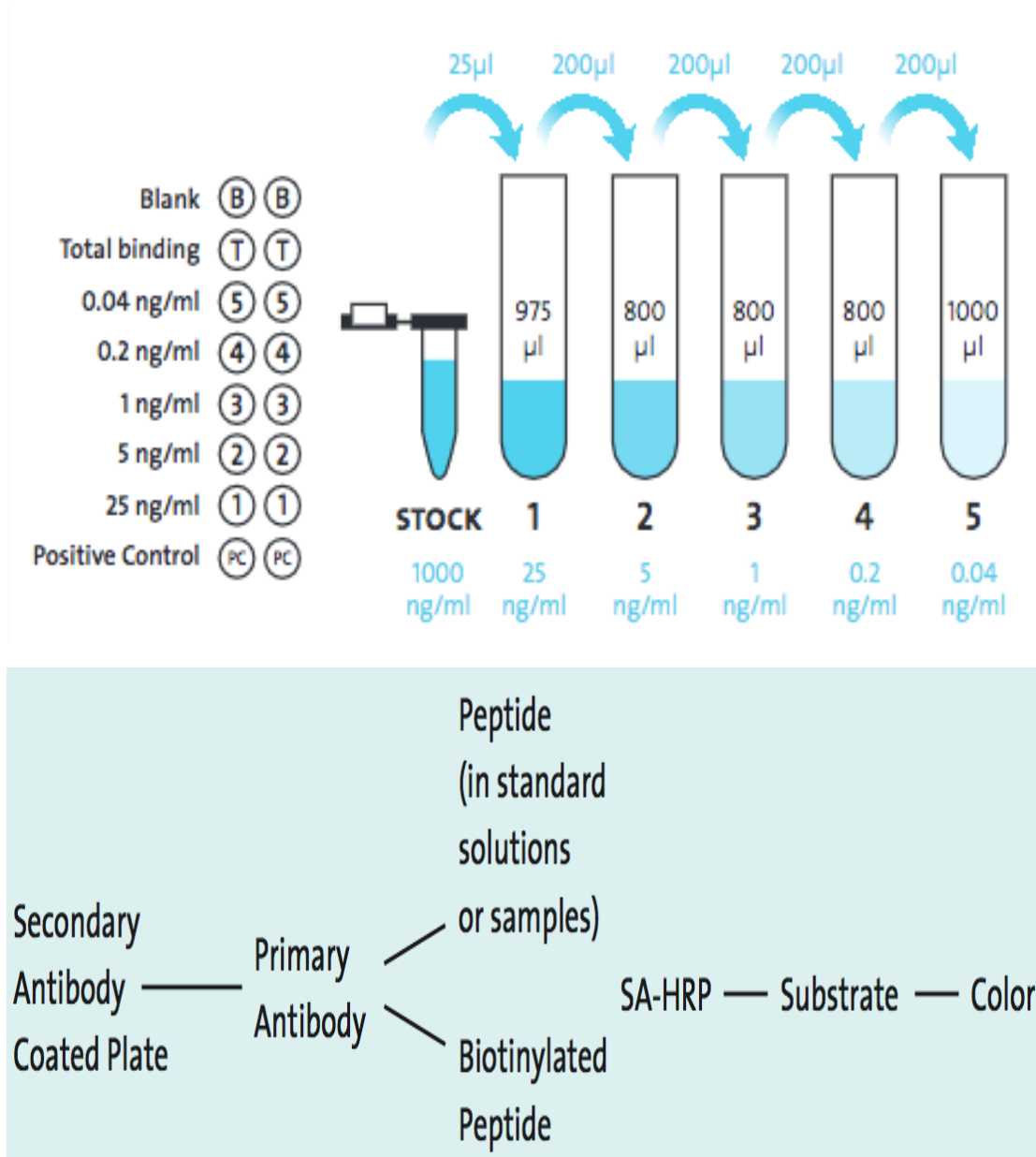


Figure 12. Illustration schématique de la méthode ELISA (compétitive) (Goldsby et al., 2003).

2.2.13. Analyse statistique des données

Ces calculs ont été effectués à l'aide d'un logiciel Minitab (Minitab® 15.1.1.0., Minitab Inc., USA). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM (*Standard Error of the Mean*). Tous les paramètres mesurés ont été traités par une analyse de variance à un critère de classification (*one-way ANOVA*). La valeur de la probabilité P est égale à 0,05. Toutes ces analyses statistiques ont été suivies d'un test post-hoc (Tukey-Kramer's) lorsqu'une différence significative est déterminée.

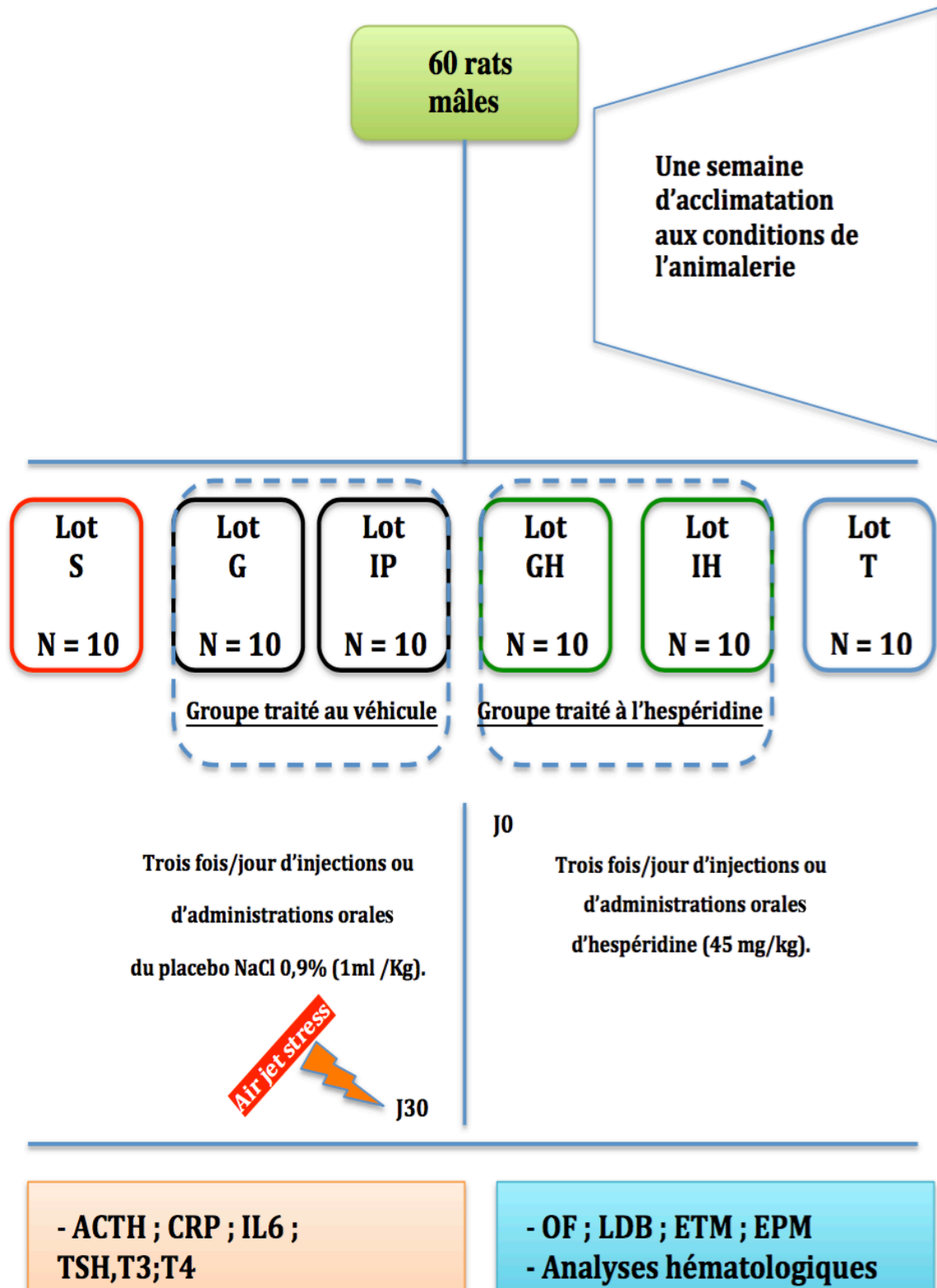


Figure 13. Protocole expérimental (1).

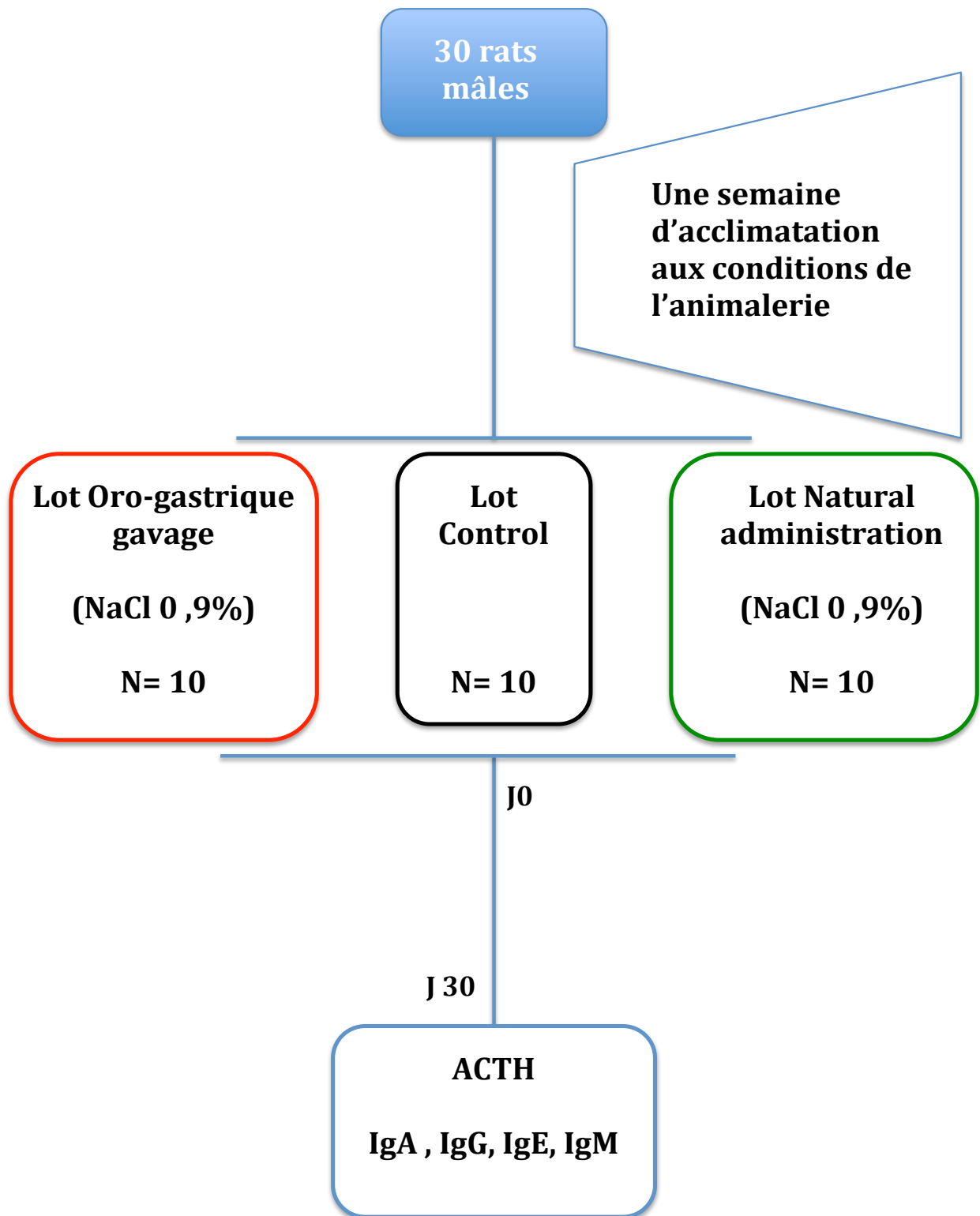
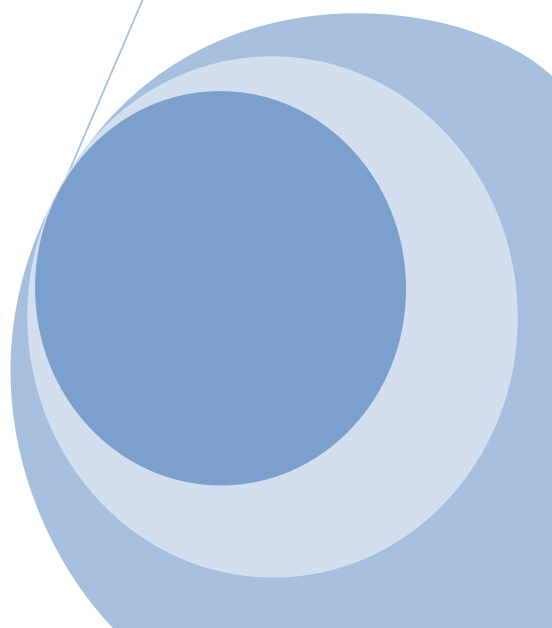
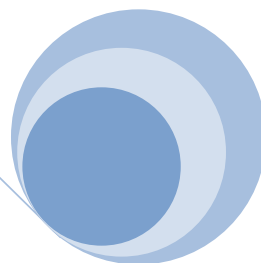
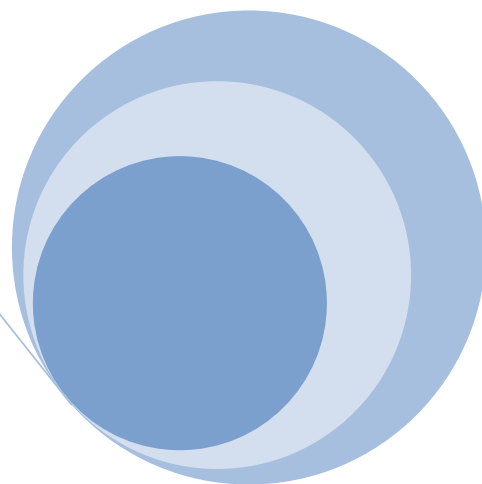


Figure 14. Protocole expérimental (2).

RESULTATS



3. RESULTATS

3.1. Comportement anxieux dans l'Elevated plus-maze test

Le comportement des rats du lot S a montré essentiellement une élévation très hautement significative du temps passé dans les bras fermés du labyrinthe ($p < 0.001$) avec une diminution très considérable du temps passé dans les bras ouverts ($p < 0.001$) comparativement aux témoins. Ces mesures ont été significativement améliorées chez les rats traités par l'hespéridine chez les lots IH et GH mais chez ce dernier l'amélioration est significativement plus importante par rapport au groupe IH ($p < 0.01$) pour le premier paramètre, ($p < 0.05$) et aussi pour le deuxième paramètre (Fig.15).

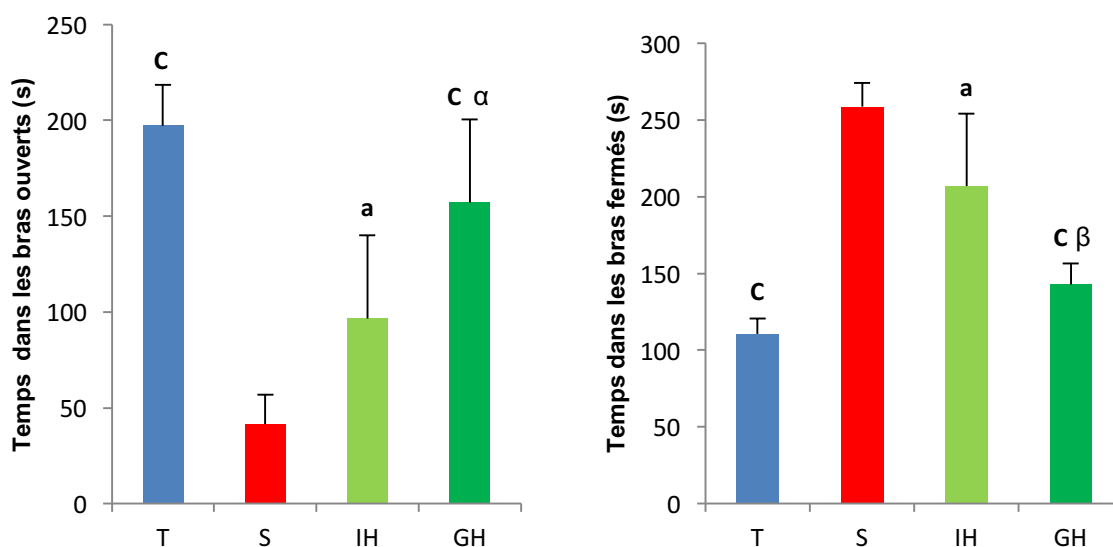


Figure15. Paramètres dans l'Elevated plus-maze des rats prétraités à l'hespéridine par deux voies orales et intra-péritonéales, exposés deux heures de temps à l'air jet stress. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $^aP < 0.05$ et $^cP < 0.001$ vs S ; $^{\alpha}P < 0.05$ et $^{\beta}P < 0.01$ IH vs GH.

3.2. Comportement anxieux dans l'Open field test

Les rats du lot stressé S passent plus de temps dans la zone périphérique et peu de temps dans la zone centrale et enregistrent moins de faculté motrice durant le test par rapport aux témoins (p<0.001). À l'opposé des GH (p<0.01) ; l'administration de l'hésperidine par injection intra-péritonéale chez le lot IH ne semble pas changer les résultats obtenus chez les rats S concernant le temps passé dans chacune des zones du test et la distance traversée (Fig.16).

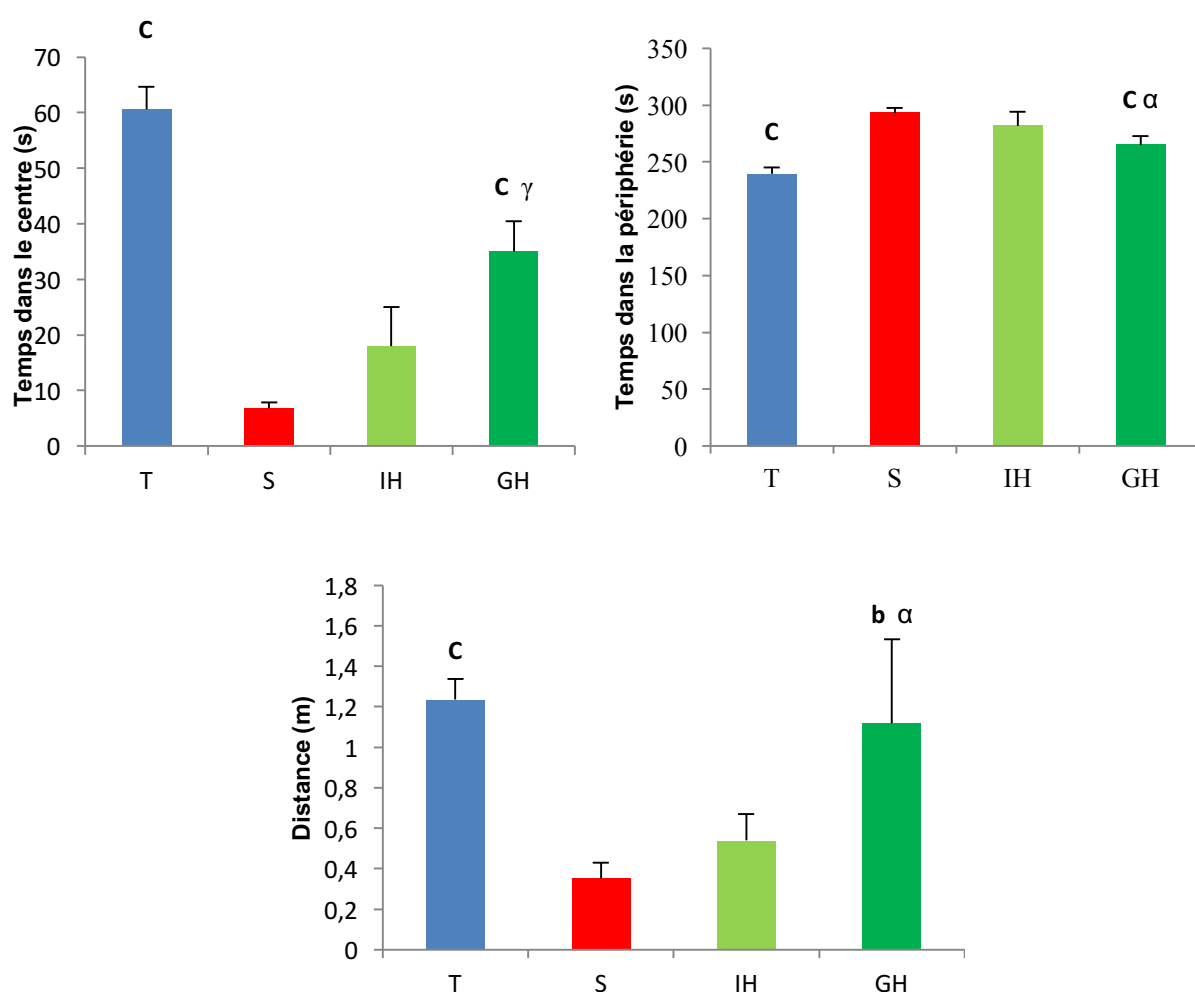


Figure16. Paramètres dans l'Open field des rats prétraités à l'hésperidine par deux voies orale et intra-péritonéale, exposés deux heures de temps à l'air jet stress. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^bP< 0.01 et ^cP< 0.001 vs S ; ^αP <0.05 et ^γP <0.001 IH vs GH.

3.3. Comportement anxieux dans le Light/ Dark Box

Les rats du lot S passent significativement plus de temps dans le compartiment obscur et moins de temps dans le compartiment claire en comparaison avec les rats témoins T ($p < 0.001$). A l'inverse du lot GH ($p < 0.05$) par rapport au lot S et IH. Le prétraitement par voie intra-péritonéale n'améliore pas les performances comportementales des rats IH dans ce test ; à raison du non existence de différence significative entre ces derniers par rapport au lot S (Fig.17).

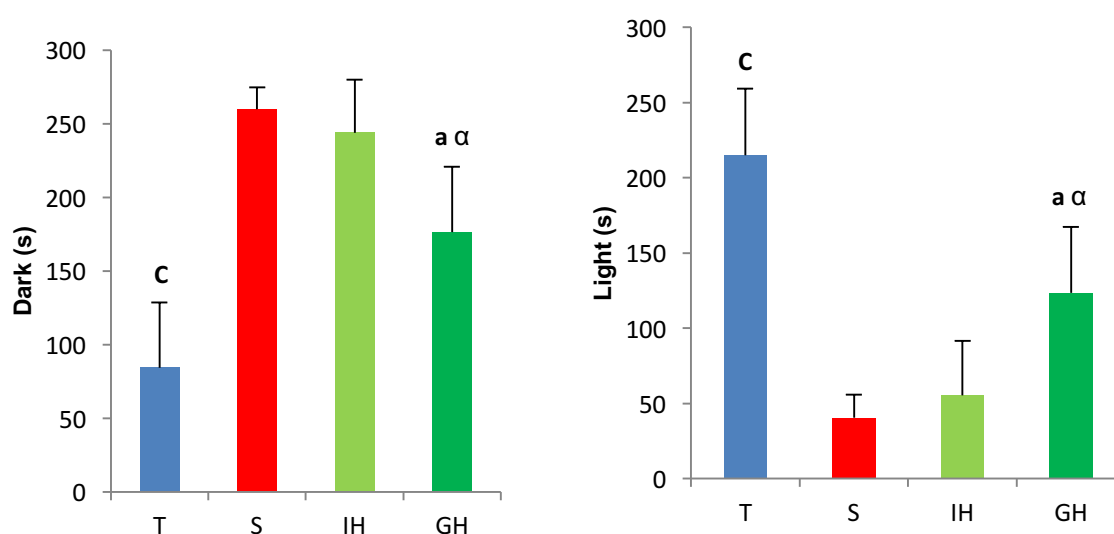


Figure 17. Paramètres dans le Light/ Dark Box des rats prétraités à l'hespéridine par deux voies orale et intra-péritonéale, exposés deux heures de temps à l'air jet stress. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^a $P < 0.05$ et ^c $P < 0.001$ vs S ; ^a $P < 0.05$ IH vs GH.

3.4. Comportement anxieux dans l'Elevated T-maze

Les rats exposés à l'air jet stress ont montré une latence d'échappement significativement faible par rapport aux rats T ($p < 0.001$). Pas de différence significative noté durant ces trois sessions d'échappements entre le lot S et le lot IH par rapport au lot GH ($p < 0.001$).

Ces derniers résultats expliqueront la différence qui existe chez le lot GH comparé au lot IH pendant les trois sessions du test ; ($p < 0.01$) pour échappement 1 et ($p < 0.001$) échappement 2 ; 3 (Fig.18).

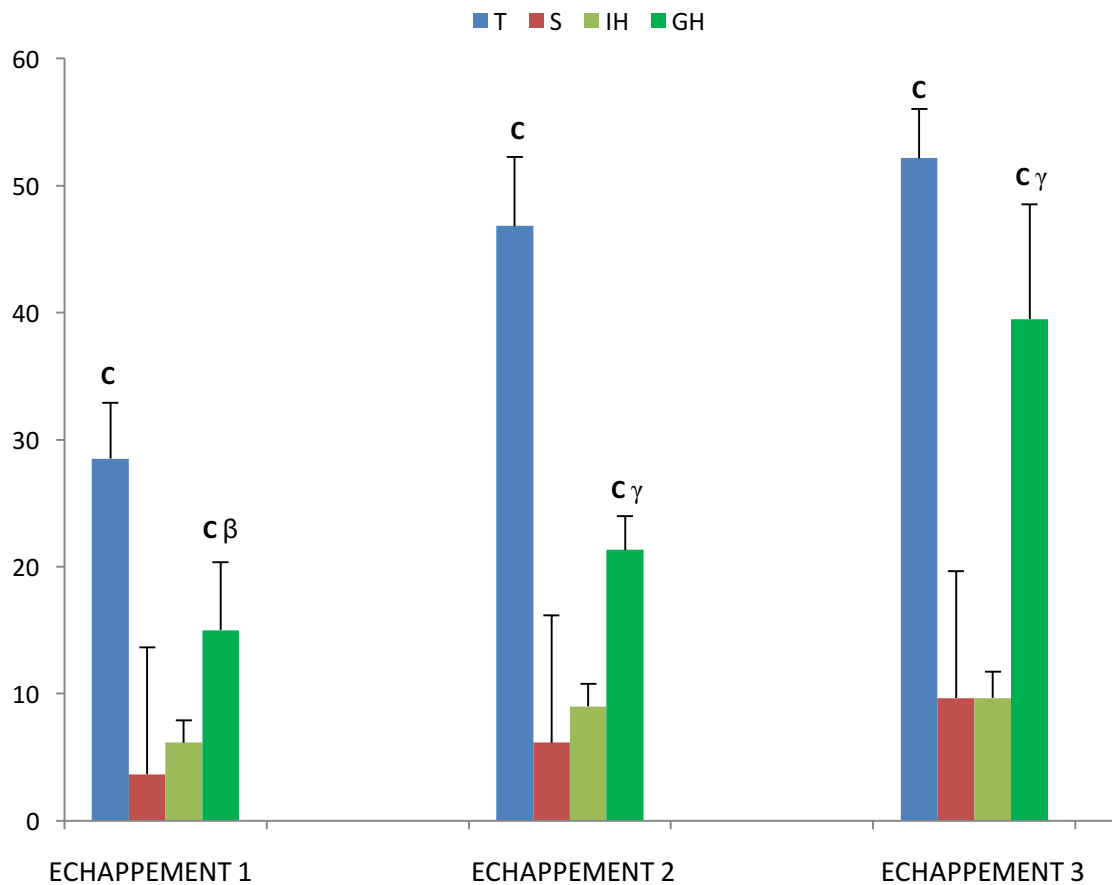


Figure 18. Paramètres dans l'Elevated T-maze des rats prétraités à l'hésperidine par deux voies orale et intra-péritonéale, exposés deux heures de temps à l'air jet stress. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. $^c P < 0.001$ vs S ; $^\beta P < 0.01$ et $^\gamma P < 0.001$ IH vs GH.

3.5. Comptage des cellules immunitaires

Les résultats de la formule lymphocytaire, montrent une augmentation hautement significative des granulocytes totaux chez les rats exposés à l'air jet stress ($p < 0.001$) comparés aux témoins T. Il semble aussi être le cas des rats

traités à l'hésperidine par voie orale où nous ne remarquons pas de différence significative par rapport au groupe S. L'opposé de ces résultats est signalé avec les taux des lymphocytes et monocytes où nous avons noté par rapport aux témoins plutôt une suppression significative chez le groupe S ($p < 0.001$). Entre le groupe GH et IH, il existe une différence significative dans la numérotation monocytaire, granulocytaire ($p < 0.05$) et lymphocytaire ($p < 0.001$) (Fig.19).

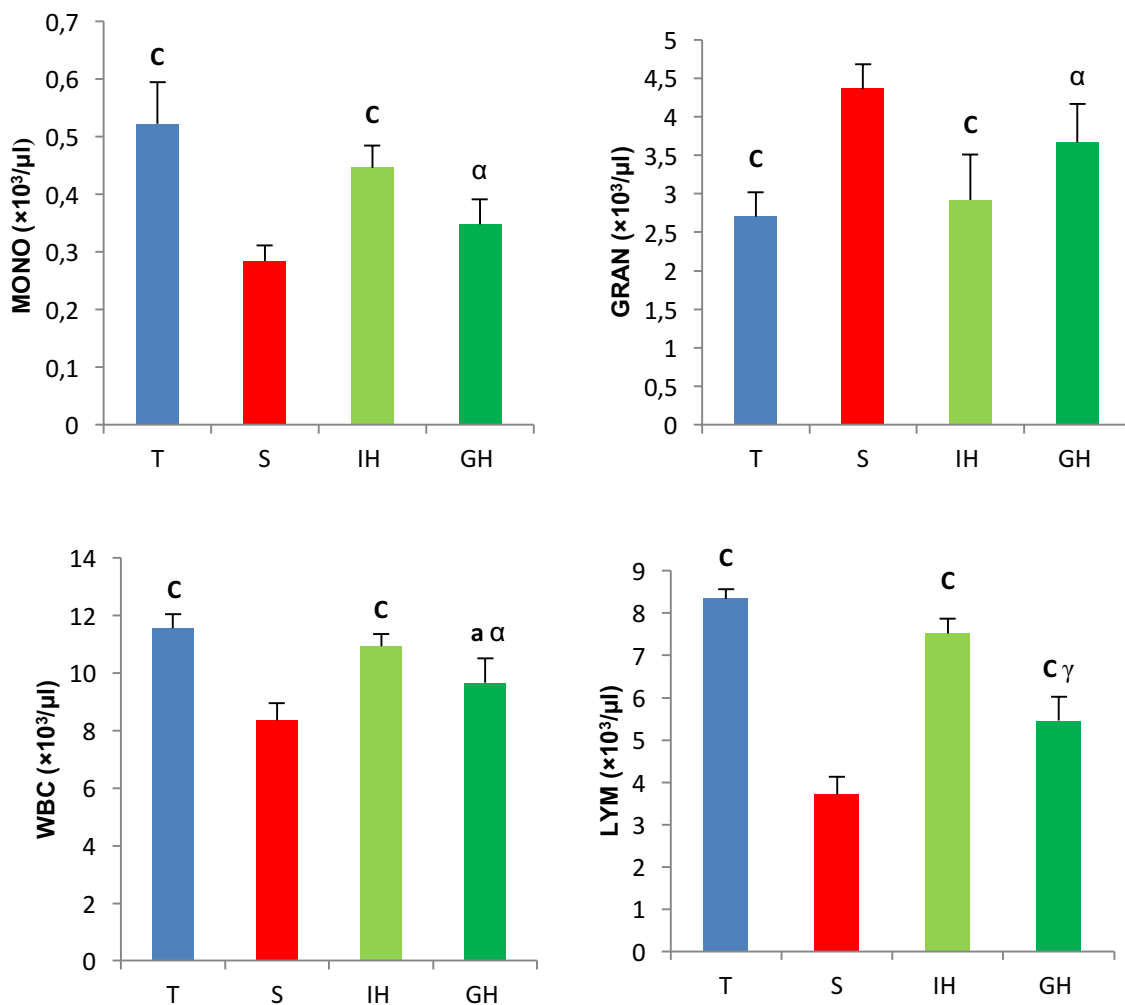


Figure 19. Comptage des cellules immunitaires des rats prétraités à l'hésperidine par deux voies orale et intra-péritonéale, exposés deux heures de temps à l'air jet stress. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^b $P < 0.01$ et ^c $P < 0.001$ vs S ; ^a $P < 0.05$ et ^{gamma} $P < 0.001$ IH vs GH.

3.6. Variation des paramètres biochimiques

Les rats stressés montrent une augmentation significative ($p < 0.05$) du cholestérol par rapport aux témoins (Fig.20c). Concernant les triglycérides, le groupe S montrent une diminution très significative ($p < 0.01$) par rapport aux témoins (Fig.20b). Pour les protéines totales, pas de différence significative entre le groupe témoins et le groupe stressé (Fig.20d). Concernant, l'activité de l'alanine amino-transférase (ALAT) et l'activité de l'aspartate amino-transférase (ASAT), les rats du groupe S montrent une augmentation très significative ($p < 0.01$) par rapport aux témoins (Fig.20a). Une variation hautement significative décelée chez les rats stressés concernant les taux de la glycémie et la phosphatase alcaline (PAL) par rapport aux témoins ($p < 0.01$) (Fig.20a).

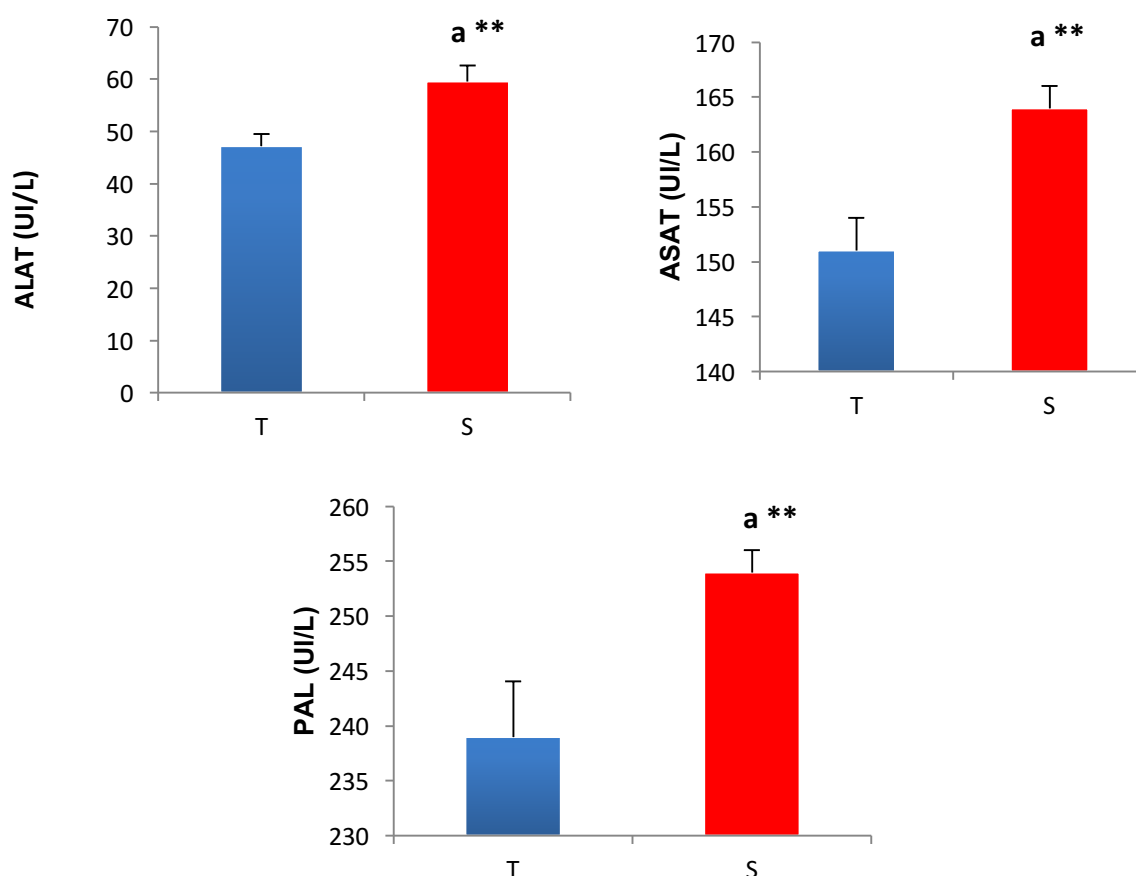


Figure 20a. Variation de la concentration d'ASAT, ALAT, PAL chez les rats témoins et stressés. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T, n=10).

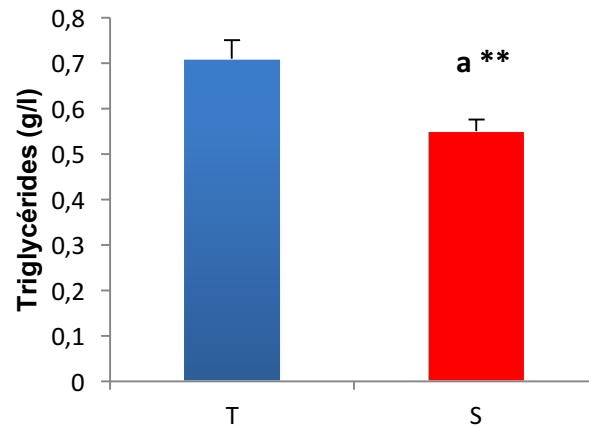


Figure 20b. Variation de la concentration des triglycérides chez les rats témoins et stressés. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T, n=10).

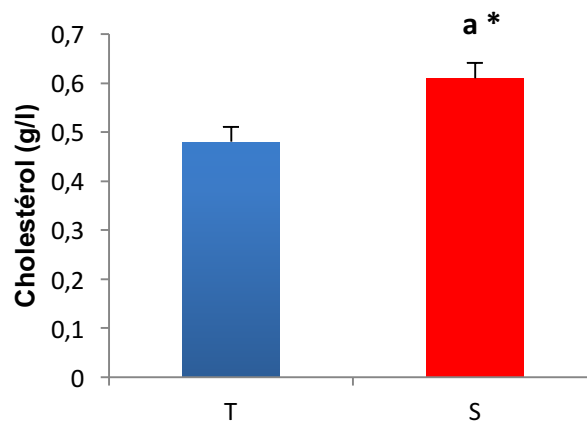


Figure 20c. Variation de la concentration du cholestérol chez les rats témoins et stressés. * $p < 0.05$ (a : comparaison vs T, n=10).

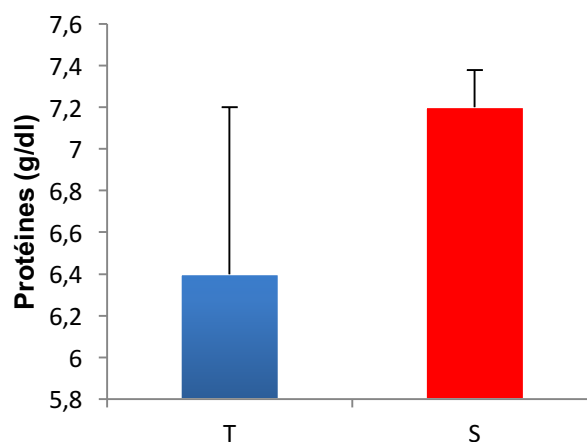


Figure 20d. Variation de la concentration des protéines totales chez les rats témoins et stressés. * $p < 0.05$ (a : comparaison vs T, n=10).

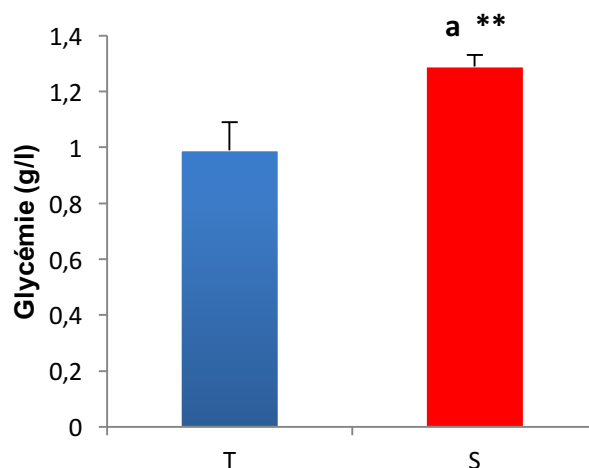


Figure 20e. Variation de la concentration de la glycémie chez les rats témoins et stressés. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T, $n=10$).

3.7. Variation des hormones thyroïdiennes

Les données sont indiquées en moyenne \pm SEM. Les valeurs P sont exprimées par rapport au groupe témoin. Les résultats indiquent que les taux sériques de TSH (Fig. 21a) et T3, T4 (Fig. 21b) ont été significativement augmentés chez les rats exposés à l'air jet stress par rapport aux animaux témoins ($p < 0.01$).

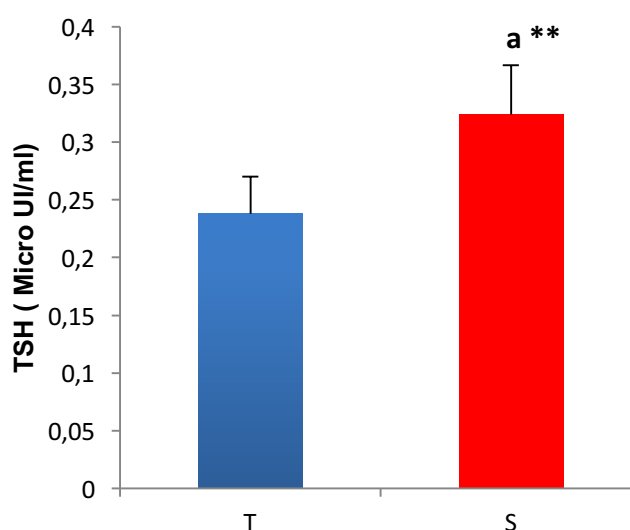


Figure 21a. Variation de la concentration du TSH chez les rats témoins et stressés. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T, $n=10$).

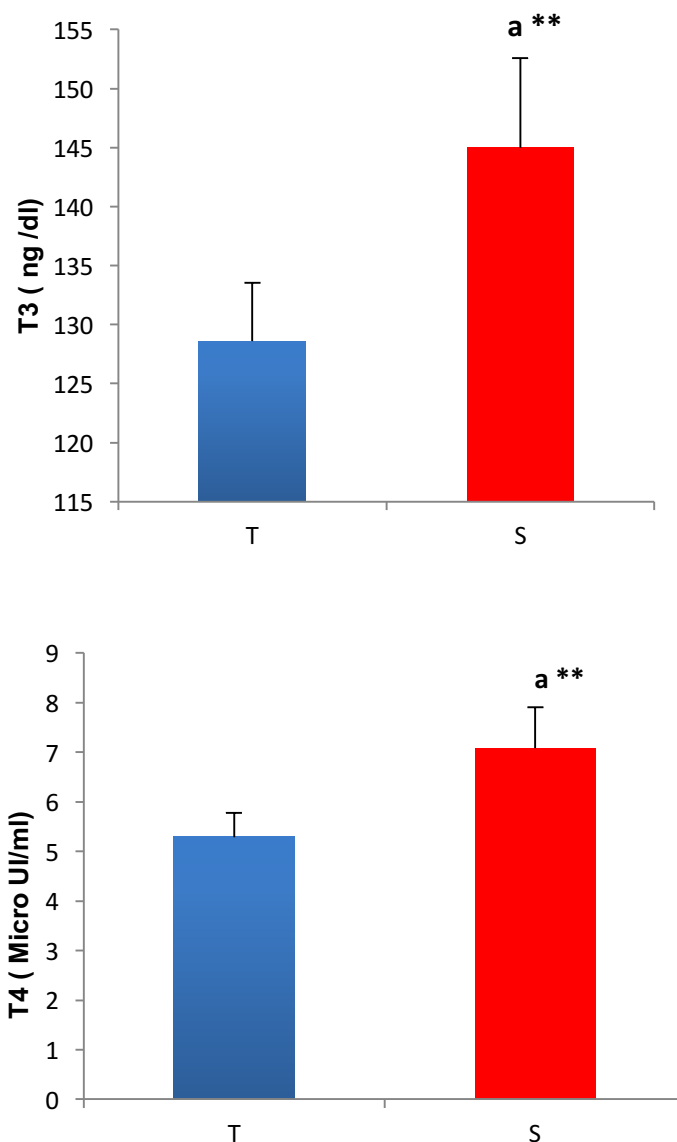


Figure 21b. Variation de la concentration du T3 ; T4 chez les rats témoins et stressés. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T, $n=10$).

3.8. Variation de la concentration plasmatique des anticorps

L'analyse statistique de ces résultats a révélé une diminution hautement significative (** $p < 0.01$) des IgG, IgA, IgE et IgM plasmatiques des rats du groupe Oro-gastrique gavage par rapport aux rats du groupe control et du groupe Natural administration (Fig.22).

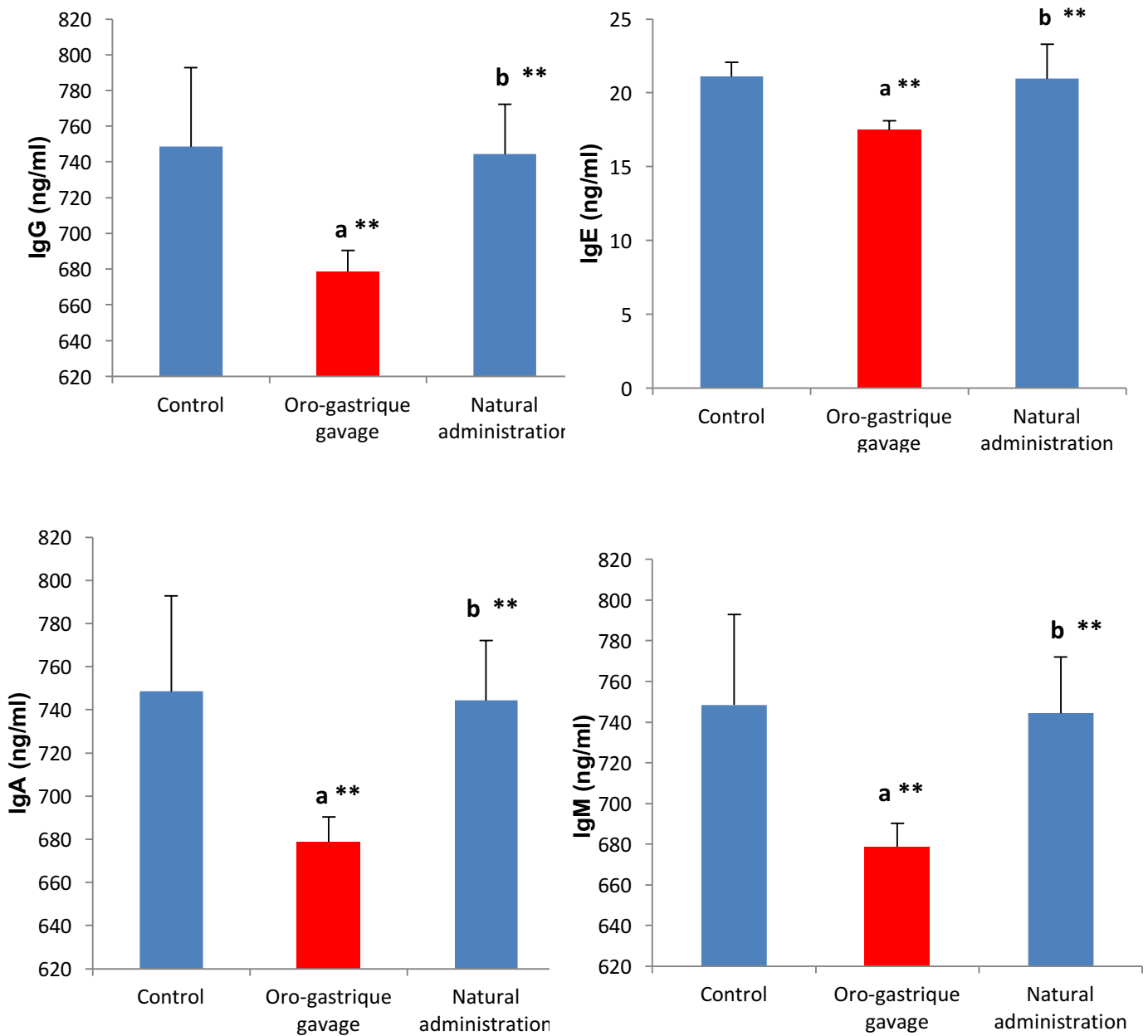


Figure 22. Variation de la concentration plasmatique des anticorps chez les rats control, Oro-gastrique gavage et Natural administration. ** $p < 0.01$ (a : comparaison vs T ; b : Oro-gastrique gavage vs Natural administration, $n=10$).

3.9. Taux plasmatiques d'ACTH, CRP, IL6

Nous avons constaté que le résultat d'un mois d'injection intra- péritonéale chez les rats a montré une augmentation significative des taux plasmatiques

d'ACTH, CRP, IL6 comparativement au groupe T et au groupe G ($p < 0.001$) concernant l'ACTH (Fig.23a) et ($p < 0.05$) pour IL6, CRP (Fig.23b ; Fig.23c). Pas de différence significative entre le groupe G et les témoins T. Les résultats de un mois de gavage montrent une augmentation très significative de la concentration plasmatique de l'ACTH par rapport au groupe témoin et à l'administration naturelle ($p < 0,001$) (Fig.23d).

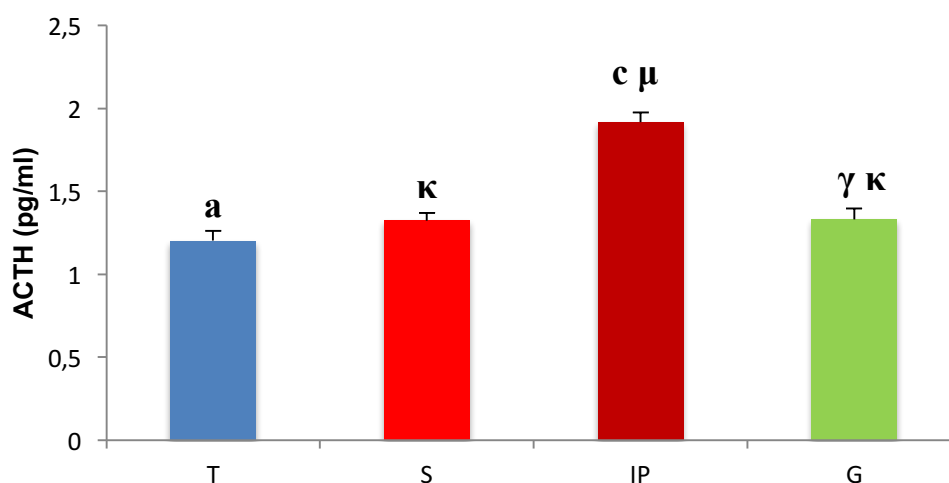


Figure23a. Taux plasmatiques d'ACTH des rats traités au véhicule de l'héspéridine (Na Cl 0.9%) par voies orale (G) et intra-péritonéale (IP). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM ^a $P < 0.05$ and ^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$ vs. S; ^a $P < 0.05$ and ^β $P < 0.01$ and ^γ $P < 0.001$ IP vs. G; ^κ $P < 0.05$ and ^μ $P < 0.001$ vs. T.

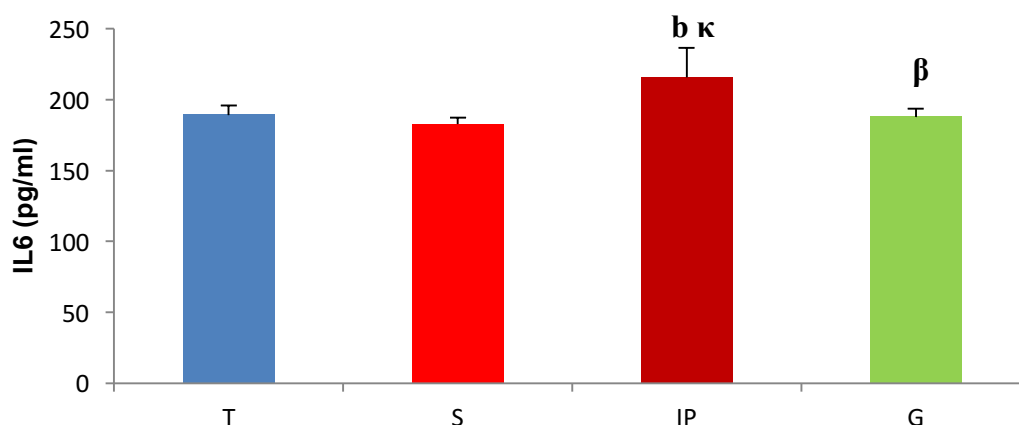


Figure23b. Taux plasmatiques d'IL6 des rats traités au véhicule de l'héspéridine (Na Cl 0.9%) par voies orale (G) et intra-péritonéale (IP). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^a $P < 0.05$ and ^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$ vs. S; ^a $P < 0.05$ and ^β $P < 0.01$ and ^γ $P < 0.001$ IP vs. G; ^κ $P < 0.05$ and ^μ $P < 0.001$ vs. T.

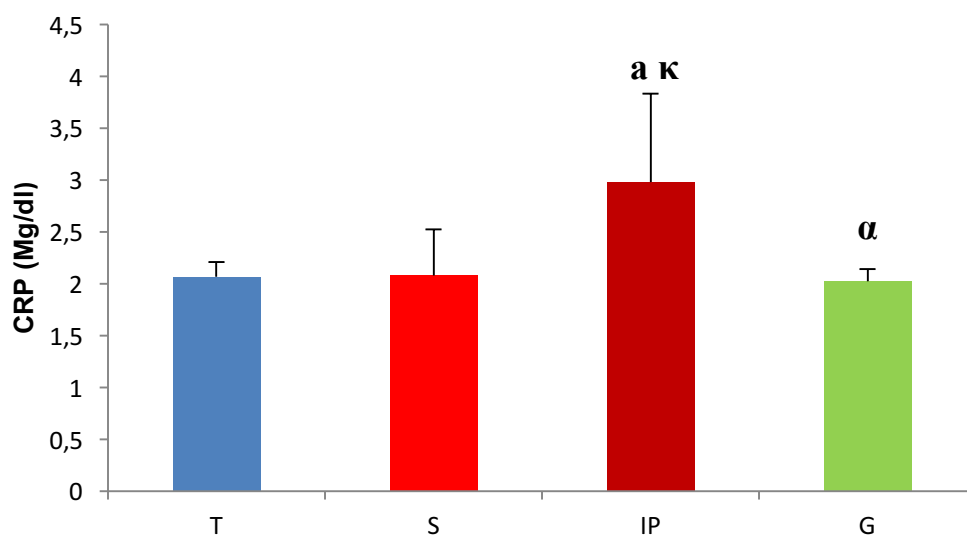


Figure 23c. Taux plasmatiques de CRP des rats traités au véhicule de l'hespéridine (Na Cl 0.9%) par voies orale (G) et intra-péritonéale (IP). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^a $P < 0.05$ et ^c $P < 0.001$ vs S ; ^α $P < 0.05$ et ^γ $P < 0.001$ IP vs G.

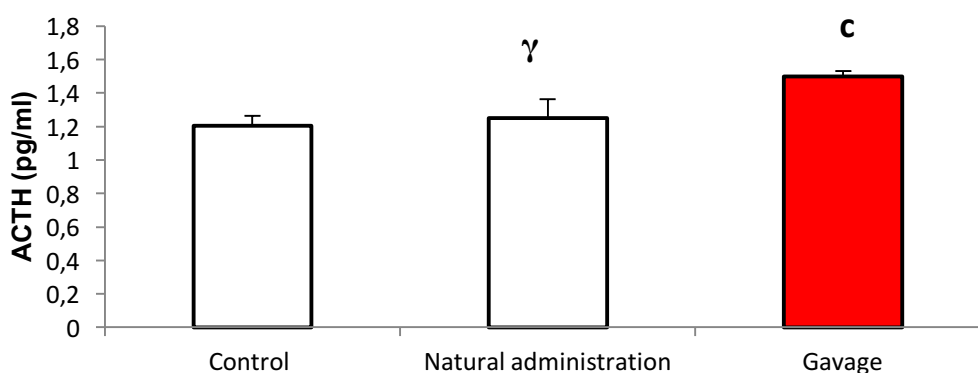
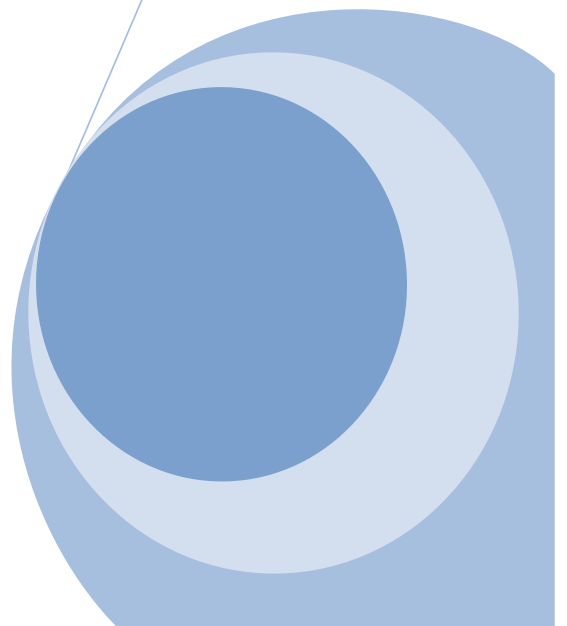
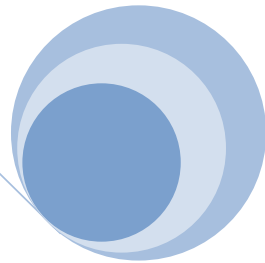
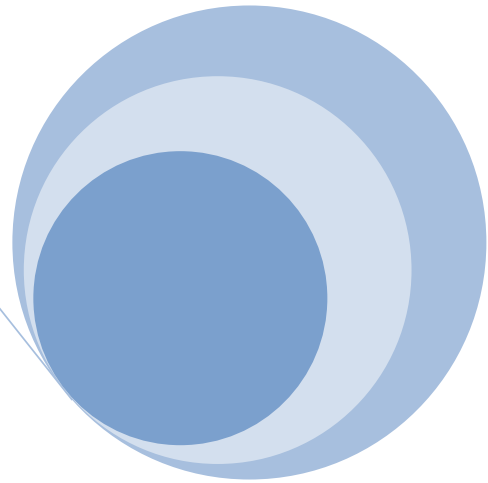


Figure 23d. Les taux plasmatiques d'ACTH chez les rats traités par placebo (Na Cl à 0,9%) par gavage et par voies naturelles. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. ^c $P < 0.001$ vs control ; ^γ $P < 0.001$ gavage vs Natural administration.

DISCUSSION



4. DISCUSSION

L'héspéridine est un flavanone glycoside très abondant dans les fruits de la famille citrus comme les oranges et les citrons (Ross and Kasum, 2002). Des applications expérimentales sur l'animal et l'homme de cette substance comportent de nombreux effets bénéfiques incluant des propriétés antioxydants, anti-inflammatoires en plus d'une capacité amélioratrice remarquable de l'activité nerveuse centrale (CNS) et hématologique (Nielsen et al., 2006 ; Yamamoto et al., 2008 ; Marder et al., 2003). Très soluble dans l'eau, elle a pu être administrée par voie orale et par voie intra-péritonéale (i.p.) dans de nombreux travaux récents comme celui de Wasowski qui démontre que son administration par voie i.p aigue et chronique produit une dépression de l'activité locomotrice et exploratrice chez la souris et le rat. Cette activité reste intacte lors de l'administration par voie orale qui induit au contraire un effet anxiolytique (Wasowski et al., 2012).

La même constatation a été obtenue dans la présente étude après un prétraitement durant un mois des rats wistar à l'héspéridine (45 mg/kg). Comparativement à l'administration orale, le lot injecté présente moins de prévention contre les altérations comportementales de l'air jet stress reflété dans L'Open field par une augmentation du temps passé dans la périphérie par rapport au temps passé dans le centre du test avec une diminution de l'activité locomotrice des rats. Dans l'Elevated plus-maze, l'effet anxiogène de l'air jet stress est exprimé par une augmentation du temps passé dans les bras fermés relativement aux bras ouverts. Ces changements comportementaux peuvent probablement être dus à des dommages au niveau des régions contrôlant les activités motrices et anxiété-like.

En effet, l'envoi d'un jet air comprimé dans la cage de l'animal (Lundin et al., 1984; Julien et al., 1988; DiBona and Jones, 1995 ; Zhang et al., 1996 ; Barrès et al., 2004 ; Kanbar et coll., 2007a) provoque un stress émotionnel psychologique qui influence sur les fonctions cérébrales en causant des changements de multiples systèmes neuronaux aboutissant à des désordres de type neurodégénératives. L'utilisation du jet d'air est une méthode simple pour induire l'hypertension chez les rats car cette technique simule un effondrement de son environnement externe qui déclenche une réponse de stress adaptative typique incluant une fréquence cardiaque accrue et une tension artérielle liée à l'action des hormones de stress. En dehors de cet aspect de stress psychologique, la différence de pression provoquée par l'envoi constant de l'air conduit le corps à déclencher une pression interne pour compenser cette différence de pression (Kalsbeek et al., 2000).

L'application chronique de ce mode de contrainte a un effet tout à fait original sur l'effet du stress sur l'axe thyroïdien, car cette interaction reste spécifique et dépend du type de stress présent dans l'environnement, de la période d'exposition, de l'intensité et de la prévisibilité, le liquide biologique, le temps d'échantillonnage hormonal et finalement les souches animales utilisées (Langer et al., 1983 ; Osko, 1996 ; Kioukia-Fougia et al., 1999). Par exemple, nous avons constaté que les niveaux de TH périphérique étaient diminués (Hohtari et al., 1987) augmentés ou inchangés (Baumgartner et al., 1988) après un stress psychique, physique ou aigu chez l'homme. Des résultats controversés ont également été observés dans des modèles expérimentaux de stress. Par conséquent, le stress d'immobilisation a été montré à la fois d'augmenter (Turakulov et al., 1994) et de diminuer T4 et T3 (Cizza et al., 1996).

L'exposition à la contrainte de choc de pied a généré une réaction de stress qui a également été associée à des augmentations ou des diminutions sur T3 (triiodothyronine) ou T4 (thyroxine) niveau (Osko, 1996). En ce qui concerne les différents paradigmes de stress, tandis que Servatius et al. (2000) ont décrit une diminution des hormones thyroïdiennes après une ou trois séances de choc de queue inéluctable, Kioukia-Fougia et al. (1999) n'ont pas observé de changements dans les niveaux plasmatiques de TH après 14 jours de stress de nage froide. Langer et al ont démontré une augmentation du taux de TH dans le plasma de rats après 2 min de stress d'immobilisation. Curieusement, TH a brusquement diminué plus tard (Pollar et al., 1979).

Dans le cas du stress léger chronique (CMS), on a observé une élévation du taux sérique de TH dans deux souches de rats différentes, sans augmentation parallèle de la TSH, l'hormone thyroïdienne (Kioukia et al., 2000). Les changements dans les taux de TSH dépendent également du type de stimuli stressants. Alors que le stress d'immobilisation a été montré pour augmenter la TSH sérique (Cizza et al., 1996). D'autres facteurs de stress, comme l'injection de lipopolysaccharide (LPS) (Kondo et al., 1997) ou pied-choc a été montré pour réduire les valeurs de TSH (Servatius et al., 2000). Concernant le travail de notre agent de stress choisi pour conduire cette expérience, il apparaît que les rats exposés chroniquement 2h / jour à l'air de jet (4 semaines) développent une surproduction de TSH. Cela est probablement dû au déclenchement de l'hypertension au cours des épisodes de stress par jet d'air, ce qui déclenche une réponse neuroendocrine anormale qui est la cause sous-jacente de la sécrétion inappropriée de la TSH chez le rat hypertensif qui est actuellement inconnue.

Un défaut impliquant l'hormone de libération de la thyrotropine (TRH) synthétisant les neurones situés dans le noyau para-ventriculaire (PVN) de l'hypothalamus pourrait être la principale cause de cette anomalie (Kondo et al., 1997). Il est bien établi que les neurones para-ventriculaires TRH qui sont soumis à une régulation de l'hormone thyroïdienne stimulent la synthèse et la sécrétion hypophysaire de la TSH et le PVN joue un rôle clé dans le développement de l'hypertension (Ciriello et al., 1984).

Puisque le PVN est directement innervé par les fibres noradrénergiques des structures du tronc cérébral impliquées dans le relais des informations cardiovasculaires et projette également aux neurones de la colonne intermédiaire de la moelle épinière, l'origine des neurones sympathiques pré-ganglionnaires. On peut s'attendre à ce que les neurones hypophysiotropes peptidergiques situés dans le PVN soient affectés par un ton sympathique accru chez les rats hypertendus (Henry et al., 1972). Il a été proposé qu'une activité excessive du système nerveux sympathique puisse être impliquée dans le début de l'hypertension. Ainsi, une augmentation de l'apport noradrénergique dans le PVN pourrait provoquer une hypertension et simultanément activer les neurones codant pour le TRH conduisant à une hypersécrétion de TSH (Qualy et al., 1988). Les taux plus élevés de TSH expliquent l'augmentation systématique des hormones thyroïdiennes T3 et T4 dans le groupe hypertendu comparativement au groupe témoin. Cependant, la régulation de la rétroaction négative devrait freiner l'augmentation du ton hypothalamique et normaliser la sécrétion de TSH élevée de l'hypophyse.

Puisque le développement du groupe de l'air comprimé de l'hypertension est associé à une hypersécrétion chronique de la TSH, nous avons émis l'hypothèse que la régulation de la rétroaction négative au niveau hypophysaire et / ou hypothalamique peut être altérée chez ces animaux (Kojima et al., 1975). En outre, de nombreuses études ont montré un lien entre le stress et l'auto-immunité et que le stress peut déclencher ou aggraver la maladie auto-immune, a également démontré que, psychologiques et physiologiques facteurs de stress induire diverses modifications immunologiques (Abbas et al., 2009)

L'exposition au stress comme l'air jet stress a conduit à la surproduction des hormones thyroïdiennes T3, T4 et il est le plus souvent causé par le développement de la maladie de Grave, une maladie auto-immune dans laquelle les anticorps sont produits qui stimulent la thyroïde à sécréter des quantités excessives de la thyroïde Hormones (Rook, 2010). Les hormones de stress résultant d'une exposition chronique au jet air agissant sur les cellules immunitaires présentant un antigène peuvent influencer la différenciation des lymphocytes B auxiliaires bi-potentiels d'un phénotype Th1 vers un phénotype Th2. Ces résultats de suppression de l'immunité cellulaire et de potentialisation de l'immunité humorale. L'auto-immunité de la thyroïde est cliniquement exprimée comme la thyroïdite de Hashimoto ou comme la maladie de Grave (Roura – Mir et al., 2010). Les différentes expressions phénotypiques de l'auto-immunité thyroïdienne dépendent largement de l'équilibre de la réponse immunitaire Th1 et Th2. La prédominance de la réponse immunitaire médiée par Th2 peut induire des lymphocytes B spécifiques de l'antigène pour produire des anticorps anti-récepteurs TSH (TSHr) provoquant la maladie de Grave (Trinchieri, 2008).

Indépendamment une relation entre cholestérol, triglycérides et les agressions dans la population humaine a été prouvée par Fowkes et al en 1992. L'augmentation des triglycérides est un indicateur d'un syndrome métabolique (Sarwar et al., 2007). Les triglycérides présentent donc une forte relation avec la dépression (Cornel et al., 2011). Le profil biochimique de la dépression est souvent caractérisé par des taux sanguins bas de cholestérol et une élévation des triglycérides. L'hypertriglycéridémie est considérée comme cause métabolique de la dépression, il a aussi été démontré dans des essais cliniques contrôlés qu'une diminution des triglycérides améliorerait les symptômes de la dépression. Le lien entre l'hypertriglycéridémie et la dépression impliquerait la résistance à l'insuline (Mössner et al., 2007).

Au niveau de l'axe thyroïdienne, nous avons trouvé une augmentation significative du poids de la thyroïde ce qui est peut-être expliqué par la synthèse excessive des hormones thyroïdiennes qui exercent un effet hypocholestérolémiant en augmentant la lipogenèse et l'oxydation des acides gras libres. Les hormones thyroïdiennes sont hyperglycémiantes (elles majorent l'absorption intestinale des glucides et favorisent la production hépatique du glucose). De nombreuses études ont démontré que la réduction de la concentration plasmatique du cholestérol est associée à des symptômes dépressifs, suicide et mort violente (Veveva et al., 2003). Le cholestérol est le principal constituant membranaire qui présente un effet sur la croissance cellulaire et sur la fonction des protéines membranaires.

Le fonctionnement d'un récepteur ou d'un transporteur pourrait être modulé directement par les interactions moléculaires spécifiques (Scanlon et al., 2001), ou indirectement affecté par le cholestérol qui induit des changements de microviscosité dans la membrane et la perméabilité (Terao et al., 2000). Il a été rapporté que les taux du cholestérol sont utilisés comme des marqueurs sanguins dans la dépression et dans l'anxiété (Rafter, 2001). Le métabolisme du glucose est un facteur résultant de l'activation des systèmes de l'organisme après une situation stressante (Hargreaves, 1990). De nombreuses études ont montré une augmentation de la concentration du glucose aussi bien après la contention que la nage forcée chez les rats (Rafter, 2001). La corticostérone est un véritable initiateur et régulateur métabolique. Cette hormone stimule l'augmentation du glucose sanguin et qui permet donc de libérer de l'énergie à partir des réserves de l'organisme. Les glucides représentent la principale source d'énergie nécessaire au métabolisme et au bon fonctionnement du cerveau et du système nerveux.

Les glucocorticoïdes ont une action hyperglycémisante par stimulation de la néoglucogénèse et par une diminution de la consommation du glucose par les tissus périphériques. Au contraire la surrénalectomie provoque une tendance à l'hypoglycémie et une grande sensibilité à l'effet de l'insuline. En situation de surrénalectomie, l'organisme se trouve dans l'incapacité de mobiliser ses réserves pour maintenir une normo-glycémie en réponse à un stress (Tempel et al., 1994). Les actions métaboliques relayées par les récepteurs aux glucocorticoïdes entraînent une augmentation de la glycémie afin de fournir aux organes vitaux une source d'énergie rapidement utilisable (Lofberg et al., 2002).

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

L'utilisation de l'hésperidine en temps qu'un bio flavonoïde naturel certes a une susceptibilité positive contre les troubles comportementaux (Haenen et al., 1997 ; Maridonneau-Parini et al., 1986) démontré dans nos résultats par l'inversement des paramètres de l'Elevated plus-maze chez les deux groupes qui reçoivent de l'hésperidine. Néanmoins la différence significative entre ces deux derniers et l'absence d'une amélioration quantifiable au niveau de l'Open field qui peut être associée au traitement par voie i.p non seulement elle est attribuable à une voie métabolique distincte pour chaque technique d'administration de l'hésperidine comme conclue (Wasowski et al., 2012) mais aussi au Handling de l'animal et la douleur des narcoses répétées de l'aiguille. Infligeant ainsi aux rats un stress à la fois psychique et physique surtout quand la procédure de l'injection dure plusieurs jours tout au long du protocole (Gartner et al., 1980). Davis et Perusse supposent que l'expérience aversive des animaux de laboratoire affaiblira le lien avec l'homme. Ceci affectera les facultés de ces animaux dans les tests comportementaux utilisés dans les recherches biomédicales (Davis and Perusse, 1988).

Ce qui fait que nous obtiendrons dans les trois sessions de l'Elevated T-maze un comportement d'échappement chez les rats injectés à l'hespéridine similaire au lot stressé avec une latence d'apprentissage révélé par une faible amélioration du temps passé dans le bras ouvert d'une session à une autre. En effet le stress issu des interactions négatives avec l'expérimentateur nuira la capacité d'apprentissage et de la cognition, compromettant ainsi l'utilité des animaux utilisés en recherche biomédicale et limitera la validité externe des données en conclusion (Wolfe, 1985; Sherwin and Olsson, 2004; Pekow et al ., 2005).

En revanche, un contact positif entre les animaux et les humains tels que nous avons maintenu en administrant l'hespéridine aux rats directement de la seringue. Après un entraînement d'habituation à la procédure pendant une semaine à l'aide d'une solution sucrée 5% peut réduire la réaction du stress associée à des pratiques expérimentales. Cela été signalé précédemment dans les résultats de l'Open field, l'Elevated plus-maze, l'Elevated T-maze en plus du test de la boîte noire et blanche. Il indique que ceux du groupe GH répondent mieux à l'antioxydant et passent significativement plus de temps dans le compartiment éclairé par contre le lot injecté semble être aussi anxieux que le lot stressé. Le gavage Oro-gastrique est une méthode de laboratoire courante en toxicologie et en études pharmacocinétiques, où il est couramment utilisé pour le dosage quotidien de rats, de souris, de lapins et de singes (Murphy et al., 2001). Il implique les contraintes physiques de manipulation et de retenue, l'insertion d'un métal rigide ou tube en plastique souple de la bouche à l'estomac, et la distension de l'estomac.

Parmi les autres facteurs potentiels du stress, on peut citer les élévations possibles de la fréquence cardiaque, de la tension artérielle et des concentrations de glucocorticoïdes qui persistent pendant 30 à 60 minutes ou plus après l'événement. Ce qui suggère que ces procédures sont extrêmement stressantes pour les animaux malgré leur utilisation courante en laboratoire (Avitsur et al, 2002). Sharp et al ont noté qu'il faut faire preuve de prudence en rejetant une procédure comme étant non stressante simplement parce qu'elle est simple ou routinière. Etre présent lorsque ces procédures sont menées sur d'autres animaux augmentent également significativement les paramètres physiologiques indicatifs de stress, au moins chez les rats, les souris et les singes.

Les rats et les souris produisent et répondent aux signaux et aux odeurs associés aux procédures de laboratoire stressantes (Fox et al., 1986). Parce que douleur, peur, stress et la détresse qui en résultent, peuvent introduire une variabilité confondante aux données scientifiques. Ces états ont le potentiel de diminuer la fiabilité des études sur les animaux. Les scientifiques en sont bien conscients et certains ont mis en garde contre les dangers de ne pas tenir compte des effets du stress, y compris ceux découlant de la routine de laboratoire comme le gavage oro-gastrique (Mason et al., 1968 ; Roberts et al., 1995 ; Brenner et al., 1990). Malgré cela, les effets négatifs de la douleur, du stress et de la détresse et leur influence sur le résultat de l'étude ne sont pas rapportés ou sous-déclarés dans des articles scientifiques publiés (Moynihan et al, 1990). Ce qui est clair, cependant, est que les effets de la manipulation peuvent altérer de façon significative le statut immunitaire des animaux, qu'ils soient améliorés ou compromis, et qu'ils pourraient avoir d'importantes implications méthodologiques (Moynihan et al, 1990).

Afin d'élucider cet aspect, le présent travail se concentre sur le complexe existant entre la technique du gavage et la distribution plasmatique des anticorps, d'ACTH dont le but de démontrer l'impact négatif d'une telle technique sur la qualité des résultats immunitaires obtenus et l'importance de maintenir un contact positif à l'aide de l'élaboration des techniques d'administrations passives pour le rat. La diminution significative des taux plasmatiques des anticorps obtenus dans nos résultats chez les rats qui ont été gavés par le placebo n'expliquent pas comment la manipulation peut affecter la santé et le bien-être des animaux, en particulier des rats, utilisés dans la recherche en laboratoire.

Ce qui est clair, cependant, est que les effets de la manipulation peuvent altérer de manière significative le statut immunitaire des animaux, soit en améliorant, soit en compromettant, et pourraient avoir des implications méthodologiques importantes (Moynihan et al., 1990; Aarstad et al., 1992). L'élaboration de nouvelles techniques d'administrations passives comme faire habituer l'animal à prendre sa dose du traitement directement de la seringue peuvent être une très bonne alternative pour préserver les taux naturels des anticorps. Cela a été démontré dans les résultats du lot naturellement administré par l'Na Cl 0,9%. En plus, adopter ce genre d'approche dans une procédure expérimentale, évite à l'animal le stress physique du gavage déclenché à la fois par la contention et l'insertion d'un métal rigide dans la bouche. Ceux-ci aboutira à une élévation des pulsations cardiaques, tension artérielle et une activation de l'axe HPA signalé dans ce travail par une augmentation significative des taux d'ACTH sanguine chez le groupe gavé par rapport au groupe naturellement administré. Selon (Brown et al, 1974), ce phénomène peut persister 30 à 60 min suite à l'événement.

D'autres études scientifiques sur les rats ont montré qu'après administration de l'eau, du Tween 80 (un surfactant non toxique) et diverses huiles de qualité alimentaire, tant le véhicule que le volume ont influencé les réponses au stress (Brown et al., 2000). En dépit de l'acclimatation préalable à l'arrêt quotidien et à l'insertion d'une aiguille de gavage sec, les rats ont démontré une augmentation dose-dépendante des taux sériques de corticostérone sur une période de 24 h. Le stress incluant celui issu du gavage oro-gastrique est connu pour produire des effets profonds sur le système immunitaire (Hitti et al., 2008).

Il influence les hormones qui lient des récepteurs spécifiques sur la membrane ou dans le cytoplasme des cellules du système immunitaire, y compris diverses cellules qui participent à la production d'anticorps. Les études expérimentales rapportent des résultats hétérogènes en relation avec le stress et les mécanismes immunitaires. Le stress à long terme peut avoir un effet préjudiciable sur le corps qui peut conduire à une maladie grave et une débilitation (Porterfield et al., 2011). Le stress peut altérer la production d'anticorps, ce qui corrobore parfaitement avec les résultats obtenus dans ce protocole où le gavage chronique a causé une activation de l'axe du stress (HPA) qui se traduit par une libération accrue d'ACTH. Ceux-ci peuvent être à l'origine de la dépression significative des anticorps chez ces rats. Le maintien par contre d'un contact doux et amical avec ces animaux en les administrant directement le véhicule, réduit les complications négatives associées. En plus de prévenir la dépression des anticorps donc maintenir les résultats au même état que les rats témoins. Ce fait ajoute un plus dans la crédibilité des résultats d'une expérimentation scientifique (Hitti et al., 2008).

Ces observations suggèrent que les interactions animal avec les humains au cours d'une administration orale d'un antioxydant naturel qui imitent les interactions positives de la même espèce sociale chez les rongeurs (par exemple, chatouilles, substituant à la stimulation tactile connue pendant le jeu désordonné, caresses, substituant aux stimuli tactiles reçus au cours de toilettage social) pourraient être utilisées comme alternatives à des récompenses qui vont substituer les effets aversifs de l'injection (Panksepp and Burgdorf, 2003; Burgdorf and Panksepp, 2001). Les changements comportementaux élucidés après exposition à l'air jet stress décèlent chez ces rats un aspect particulier de distribution immunitaire ; une dépression lymphocytaire accompagnée d'une élévation importante de la numérotation granulocytaire. Effectivement des travaux scientifiques ont prouvé que l'exposition des rongeurs à un défi social important telle qu'un épisode de deux heures de jet air augmente la proportion granulocytaire et diminue celle des lymphocytes (Stefanski and Engler, 1999). Il est possible que les lymphocytes s'accumulent dans la moelle osseuse (Stefanski and Peschel., 2003).

Par ailleurs, le stress psychologique peut aussi être derrière un niveau élevé des dommages oxydatifs, capables de perturber la balance prolifération /apoptose cellulaires sanguines (Irie et al., 2003; Epel et al., 2004; Forlenza and Miller, 2006; Gidron et al., 2006 ; Voehringer et al., 1999 ; Irani K, 2000 ; Shackelford et al., 2000). Le mécanisme exact reste non clair néanmoins les chercheurs soupçonnent la médiation des glucocorticoïdes liée au stress (Radak et al., 2005). Le prétraitement à l'héspéridine a pu en partie prévenir ces altérations immunitaires déclenchées par le renvoi du jet air chez les rats traités car elle présente en même temps des propriétés antioxydantes importantes en agissant à travers plusieurs systèmes physiologiques de l'orgasme (Herbert et

al., 1993 ; Deng et al., 1997 ; Suarez et al., 1998 ; Jovanovic et al., 1994 ; Garg et al., 2001 ; Nandakumar et al., 2012). En plus, une action directe sur l'axe du stress corticotrope (HPA) que selon Cai et al, elle inhibe l'expression de l'ARNm des CRF dans l'hypothalamus et régule la hausse d'expression de la protéine GR (Cai et al., 2013). Mais ce qui reste curieux à comprendre dans les résultats obtenus, pourquoi au sens contraire des tests comportementaux réalisés, l'hésperidine injecté semble mieux restaurer les valeurs des cellules blanches des dommages du air jet stress que la voie orale ?

Quelques études suggèrent qu'il existe une fenêtre précise dans laquelle le développement de la réponse spécifique peut être altérée par le stress. Lors d'une réponse primaire, l'exposition au stress juste avant ou pendant les 24 heures suivant la vaccination serait une période critique. Un stress survenant plus tardivement n'aurait que peu ou pas d'effet (Kusnecov and Rabin, 1993; Moynihan et al., 1990; Wood et al., 1993; Zalcmann et al., 1988). A partir de ces travaux, nous pouvons avancer que le Handling couplé à la procédure de l'injection elle-même répétée pendant un mois forme un pseudo- stress chronique qui va empêcher une déviation immunitaire lors de l'exposition à l'air jet stress. Une déviation a été remarquée chez les rats du lot GH dont l'absence d'un contact aversif, les rends immunologiquement naïfs face à une séance stressante de forte amplitude. La négligence d'un tel processus d'immuno - résistance par les chercheurs va probablement diminuer la qualité des données immunitaires récoltées en surestimant l'efficacité immuno-pharmacologique d'un produit naturel quelconque dont l'hésperidine. Cela est dû à la non considération de l'impact anxiogène de la technique du traitement sur le statut psychologique du modèle expérimental.

A la base, un placebo est utilisé sur des animaux considérés comme groupe contrôle de l'expérience quand la comparaison avec le groupe actif s'impose (Nessaibia et al., 2015). L'administration du placebo sert à la distinction de l'effet causé par l'administration elle-même de l'effet du traitement et pour assurer une meilleure exécution de l'analyse scientifique des données. Le traitement est dissous fréquemment dans le même véhicule que le placebo. Ce qui est partiellement juste justifiant que les injections effectuées de manière répétée sur des rongeurs avec un simple placebo auraient des effets inverses du traitement actif souhaité en déclenchant une réponse physiologique et comportementale identique face à un stressor classique (Drago et al., 2001). La présence d'un pseudo stress liée aux injections intra-péritonéales qui précède l'application du jet air et sera peut-être originaire de l'immuno-résistance. Il a été mis en évidence dans ce protocole par des lots traités uniquement au véhicule de l'hésperidine (placebo) en respectant le même délai du traitement avec l'hésperidine durant 30 jours. Nous avons enregistré une réponse typique d'un stress qui consiste à une élévation des taux plasmatiques d'ACTH et d'IL6 à la fin de trente jours d'injection du véhicule NaCl 0,9%.

La production significative des CRP accompagnées est associée aux taux d'IL 6 qui généralement modifient l'expression des protéines de la phase aigüe : C-reactive protein, sérum amyloïde A (SAA), haptoglobine, orosomucoïde, fibrino-gène. Parmi ces protéines, la CRP actuellement reconnue comme le marqueur de choix de la réponse inflammatoire qui accroît la production de cytokines de type inflammatoire donc amplifier les taux IL6 eux-mêmes (Gabay et al., 1999 ; Banks et al., 1995). La modulation de la réponse immunitaire est induite par un complexe des signaux bidirectionnels qui fait intervenir le système nerveux, endocrinien et immunitaire (Blalock et al., 1994 ; Lambrecht et

al., 2001). La sécrétion d'IL6 avec d'autres cytokines pro-inflammatoires est stimulée directement par la dépression et autres émotions négatives et expériences stressantes qui incluent les injections.

D'un autre côté l'IL6 est un activateur potentiel de l'axe HPA (Liu et al., 2007). Ce qui se traduit par la libération d'ACTH, l'hormone excitatrice majeure des glucocorticoïdes. Après une session d'injections chroniques ou un stress psychique, la sensibilité des cellules immunitaires à l'effet des glucocorticoïdes diminue (O'Connor et al., 2003 ; Stark et al., 2002). Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la résistance aux glucocorticoïdes par le stress ne sont pas entièrement élucidés. Le stress ne modifie pas l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). En revanche, il empêche la migration du GR du cytoplasme vers le noyau (Quan et al., 2003). Le stress empêche donc le complexe GR-hormone d'inhiber la transcription des gènes de la voie NFkB tels que ceux des cytokines pro-inflammatoires. Il est possible que l'activité physique associée aux manipulations expérimentales de l'animal au cours d'une injection soit en partie impliquée puisque l'exercice physique chez l'humain diminue aussi la sensibilité des lymphocytes sanguins à la dexaméthasone, un stéroïde de synthèse (Derijk et al., 1996). Le stress et activité physique induisent une libération d'IL-6 plasmatique, son rôle potentiel dans l'induction de la résistance a été testé *in vitro* (Stark et al., 2002).

The image features a minimalist design with three blue circles of varying sizes and two thin blue lines. The circles are composed of concentric layers of different shades of blue, creating a 3D effect. One large circle is in the upper right, a smaller one is in the center, and another large one is in the lower right. Two thin lines originate from the top left and extend towards the circles, one ending near the top circle and the other near the bottom circle.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

En conclusion, nous avons dans ce travail prouvé que ce soit par injection intra - péritonéale ou par voie orale l'héspéridine (45mg/kg) maintiennent une efficacité préventive contre les altérations neurocomportementales et immunologique qui peuvent être induites lors d'un stress psychique comme c'est le cas du jet air stress. Toutefois ce travail approuve la considération des techniques non invasives comme l'administration orale où l'animal assure un lien de contact positif avec l'expérimentateur et évite l'agressivité physique du Handling et la douleur des narcoses répétées. Non seulement, comme nous avons démontré que le traitement par le véhicule est une source d'un pseudo-stress indésirable qui va compromettre les données des tests comportementaux au moment du traitement avec l'héspéridine en déclenchant une réponse corticotrope d'ACTH et de cytokine pro-inflammatoire.

En prime de l'air jet stress, cette réponse amplifiera le statut anxieux de l'animal. Finalement retarder son effet bénéfique anxiolytique mais aussi agit sur les données de la formule immunitaire. Cela est dû probablement à l'augmentation des IL6 plasmatiques accompagnés par les taux des CRP connus pour affecter la sensibilité des cellules immunitaires aux glucocorticoïdes. Ces perturbations mettent en question la clarté des résultats comportementaux et immunitaires de tout travail de recherche focalisé sur les bénéfices des antioxydants naturels dont l'héspéridine. En conséquence, nous appuyons dans un protocole expérimental, la distinction entre le groupe contrôle qui reçoit le véhicule (placebo) et le groupe témoin intact dont le but d'isoler l'action du médicament sur le groupe actif de l'effet de l'administration elle-même.

A partir de ses résultats, il serait intéressant plus au moins à court terme, de réaliser les perspectives suivantes :

- Tester l'effet de l'hespéridine en appliquant des doses différentes avec vérification de l'équivalence de biodisponibilité sanguine de cette molécule en utilisant les deux techniques d'administrations (administration orale ; injection intra-péritonéale).
- Doser les enzymes antioxydants pour une évaluation plus approfondie des effets de l'hespéridine.
- Compléter le tableau des cytokines pro-inflammatoires en plus d'un dosage de la corticostérone pour plus de précision dans les résultats.
- Évaluer les effets du pseudo-stress dans une expérimentation sur les fonctions neuroendocriniennes et immunitaires de l'organisme maternel. Ceci correspondra aux dosages d'un nombre d'hormones (l'œstradiol, la progestérone et la prolactine) et des cytokines (les interleukines IL-1 et IL-2, le facteur de nécrose tumorale TNF- α) clés.
- Accomplir les données obtenues par des ECG cardiaques pour la détection de toute altération déclenchée par le jet air stress.
- Étudier les complications neurocomportementales liées aux techniques d'administrations aversives et à la manipulation agressive sur la progéniture et observer si elles sont transmissibles (recherche épi-génétique).

A decorative graphic consisting of three blue circles of varying sizes, each with a darker blue center and a lighter blue outer ring. Two thin blue lines intersect at the top left, forming a large 'V' shape that frames the circles. The circles are positioned in the top right, middle, and bottom right areas of the page.

**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Angrini M, Leslie JC, Shephard RA. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 387–97.
- Aarstad H J and Seljelid R 1992. Effects of stress on the growth of a fibrosarcoma in nu/nu and conventional mice. *Scand J Immunol* 1992; 35:209-215.
- Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Sheridan JF. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J Neuroimmunol* 2002 ; 132:66–71.
- Abbas, A.K., Murphy, W. B. K. M., Sher, A. (2009), Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature*, 383, 787 - 795.
- Arrant AE, Jemal H , Kuhn CM. Adolescent male rats are less sensitive than adults to the anxiogenic and serotonin-releasing effects of fenflurmine. *Neuropharmacology* 2013; 65:231-22.

B

- Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J, Illingworth JM, Perren TJ, Selby PJ, Whicher JT. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* 1995 ; 102 : 217-23.
- Barrès C, Cheng Y, Julien C. Steady-state and dynamic responses of renal sympathetic nerve activity to air-jet stress insinoortic denervated rats. *Hypertension* 2004; 43: 629-635.
- Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front. Neuroendocrinol* 2007 ; 28 (1) : 28–49.
- Baumgartner, A., Graf, K.J., Kurten, I., Meinhold, H. (1988), The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in psychiatric patients and healthy subjects: parts 1e4. Part 4: TRH tests, thyroxine, trimdothyronine, and reverse triiodo- thyronine determinations in medical students during a major examination. *Psychiatry Res*, 24, 316-332.
- Besedovsky H, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrinol* 1996 ; 17 : 64-102.
- Brown A P, Dinger N and Levine B S. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000; 39 (1): 17-21.

- Brown G M and Martin J B. Corticosterone, prolactin, and growth hormone responses to handling and new environment in the rat. *Psychosom Med* 1974; 36:241-247.
- Burtis, A.1999. Proteines totales. *Textbook of Clinical Chemistry*. 3rd ed.
- Besedovsky HO and Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* 1996; 17: 64-102.
- Blalock J E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews* 1989; 69: 1-32.
- Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994;15: 504–11.
- Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol. Behav* 2001; 72: 167–173.
- Blalock JE. The immune system as a sensory organ. *J-Immunol*. 1984 ; 132 : 1067-1070.

- Brenner G J N, Cohen, Ader R et al. Increased pulmonary metastases and natural killer cell activity in mice following handling. *Life Sci* 1990; 47:1813-1819.

C

- Cai L , Li R, Wu QQ, Wu TN. Effect of hesperidin on behavior and HPA axis of rat model of chronic stress-induced depression. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*.2013; 38 (2):229-33.
- Claude J, Thurin J M. Stress, immunité et physiologie du système nerveux .*médecine sciences* 2002 ; 18 (11) :1160-1166.
- Coryell, W., Noyes, R. Placebo response in panic disorder. *Am. J. Psychiatry*
- Costall B, Jones B J, Kelly M E, Naylor R J & Tomkins D M. *Pharmacol. Biochem. Behav* 1989; 32: 775-785.
- Cizza, G., Brady, L., Escpales, M., Blackman, M., Gold, P., Chrousos, G. (1996), Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic–pituitary–thyroidal function in Fisher 344/N rats. *Neuroendocrinology*, 64, 440–448.
- Ciriello, J., Kline, R.L., Zhang, T. X. and Caverson, M.M. (1984), Lesions of the paraventricular nucleus alter the development of spontaneous hypertension in the rat, *Brain Res.*, 310, 355-359.

- Cristina W, Leonardo M. Loscalzo, Higgs J and Marder M. Chronic Intraperitoneal and Oral Treatments with Hesperidin Induce Central Nervous System Effects in Mice PHYTOTHERAPY RESEARCH *Phytother* 2012; 26: 308–312.
- Calvez J. Stress et prise alimentaire Application à l'étude de l'effet anti-stress d'un extrait de levure chez le rat. Thèse de doctorat. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). 2010.
- Chrousos GP, Gold P W. the concept of stress and stress system disorders .*JAMA* 1992 ;267,(9) 1244.

D

- Davis H, Perusse R. Human-based social interaction can reward a rat's behavior. *Anim. Learn. Behav* 1988; 16: 89–92.
- Dhabhar, Yali Su , Elissa Epel. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *psych neuroendocrinology* 2013; 38 (9): 1698–1708.
- Deng W, Fang X, Wu J. Flavonoids function as anti-oxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiat Phys Chem* 1997; 50(3): 271-6.

- Derijk R , Petrides J , Deuster P, Gold P W , Sternberg E M. Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1996; 81: 228-235.
- Dhabhar F S, Miller A H, McEwen B S and Spencer R L. Effect of stress on immune cell distribution, Dynamics and hormonal mechanisms. *The Journal of Immunology* 1995; 154: 5511-5527.
- DiBona GF, Jones SY. Analysis of renal sympathetic nerve responses to stress. *Hypertension* 1995; 25: 531-538.
- Dorshkind K and Horseman N D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays* 2001; 23: 288-294.
- Drago F , Nicolosi A, Micale V , Menzo G. Placebo affects the performance of rats in models of depression: is it a good control for behavioral experiments? *European Neuropsychopharmacology* 2001; 11: 209–213.

E

- Elenkov I J, Wilder R L, Chrousos G P and Silvester Vizi E. The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews* 2000; 52:595-638.

- Epel E S, Blackburn E H Lin J, Dhabhar F S, Adler N E, Morrow J D, Cawthon R M. Accelerated telomere short-ening in response to life stress. PNAS 2004; 101: 17312-17315.
- Estanislau C, Morito S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. Behav Brain Res 2005; 163:70–7.

F

- Felten S Y and Felten D L 1991. Innervation of lymphoid tissue. In Psychoneuro-immunology (ed. R. Ader, D. L. Felten and N. Cohen), pp. 27-69. Academic Press, San Diego, California.
- Fox M W. Laboratory animal husbandry: ethology, welfare and experimental variables. State University of New York Press,Al- bany 1986.
- Forlenza M J, Miller G E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. Psychosom. Med 2006; 68: 1-7.
- Fernandez S P, Wasowki C, Loscalzo L M, Granger R E, Johnston G A R, Paladini A Cet Marder M (2006) central nervous system depressant action of flavonoid glycosides European Journal of Pharmacology. 539: 168-176.

G

- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999; 340 : 448-54.
- Garg A, Garg S, Zaneveld L J, and Singla A K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother* 2001; 15(8): 655-69.
- Gartner WS, Wilson RA. Teflon granuloma mimicking a thyroid tumor. *Diagn Cytopathol*, 1980; 3(2):156-80.
- Gidron Y, Russ K, Tissarchondou H, Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review. *Biol. Psychol* 2006 ; 72: 291-304.
- Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A. et J. Kuby, « Enzyme-Linked Immunosorbent Assay », in *Immunology*, 5e édition, pages 148-150, W. H. Freeman, New York, 2003.
- Gobira PH, Aguiar DC, Moreira FA. Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the T maze. *Pharmacol.Biochem Behav* 2013;110 :33-9.

- Grandin T, Rooney M.B, Phillips M, Cambre R.C, Irlbeck N.A, Graffam W. Conditioning of nyala (*Tragelaphus angasi*) to blood sampling in a crate with positive reinforcement. *Zoo Biol* 1995; 14: 261–273.

H

- Haenen G R M, Paquay JBG, Korthouwer R E M and Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1997 236; (3): 591–593.
- Hall, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology*, Vol 18(3), Dec 1934, 385-403.
- Henry, J. L., and Calaresu, F. R. (1972), Topography and numeral distribution of neurons of the thoraco-lumbar intermediolateral nucleus of the cat, *J. Comp. Neurol.*, 144, 205-214.
- Hargreaves KM. Neuroendocrine markers of stress. *Anesth Prog* 1990 ; 37, 99-105.
- Hirano,T.; Matsuda,T.; Turner,M.; Miyasaka,N.; Buchan,G.; Tang,B.; Sato,K.; Shimizu,M.; Maini,R.; Feldmann, M.; Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* 1988; 18:1797-1801.

- Hohtari, H., Pakarinen, A., Kauppila, A.(1987), Serum concentrations of thyrotropin, thyroxine, triiodothyronine and thyroxine binding globulin in female endurance runners and joggers. *Acta Endocrinol*, 114, 41-46.
- Hitti M, Chang L. Chronic fatigue syndrome linked to hormone. *J ClinEndocrinolMetab*2008; 22:326-30.
- Herbert T, Cohen S. Stress and immunity: a meta-analytic review. *Psychosom Med* 1993 ; 55 : 364-79.
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer* 2005; 25:3367–74.
- Hosoi, J., Tsuchiya, T., Denda, M., Ashida, Y., Takashima, A., Granstein, R. D. and Koyama, J. Modification of LC phenotype and suppression of contact hypersensitivity response by stress. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 1998, 3, 79-84.

I

- Irani K. Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signalling. *Circ Res* 2000; 87:179-83.

- Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H. Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003 ; 311: 1014—1018.

J

- Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as anti-oxidants. *J Am Chem Soc* 1994; 116(11): 4846-51.
- Julien C, Cerutti C, Kandza P, Barrès C, Su D, Vincent M, Sassard J. Cardiovascular response to emotional stress and spontaneous blood pressure variability in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988 ; 15: 533-538.

K

- Kanbar R, Oréa V, Barrès C, Julien C. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292: 362-367.
- Kioukia-Fougia, N., Christofidis, I., Strantzalis, N. (1999), Physicochemical conditions affecting the formation/stability of serum complexes and the determination of prostate-specific antigen (PSA). *Anticancer Res*, 19 (4B), 3315-3320.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A., Wortel, J., Buijs, R. (2000), Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology*, 141, 3832–3841.

- Kojima, A., Kubota, T., Sato, A., Yamada, T., Yamori, Y. and Okamoto, K. (1975), Con-genital abnormality of pituitary-thyroid axis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone rats (SPR) (39081), Proc. Soc. Exp. Biol. Med, 150, 571-573.
- Kioukia, N., Bekris, S., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Christofidis, I. (2000), Ef-fects of chronic mild stress (CMS) on thyroid hormone function in two rat strains. Psychoneu-roendocrinology, 25 (3), 247-257.
- Kondo, K., Harbuz, M., Levy, A., Lightman, S. (1997), Inhibition of the hypothal-amic-pituitary-thyroid axis in response to lipopolysaccharide is independent of changes in circulating corticosteroids. Neuroimmunomodulation ,4, 188-194.
- Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A., Wortel, J., Buijs, R. (2000), Functional connections between the suprachiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and vi-ral tracing techniques in the rat. Endocrinology, 141, 3832–3841.
- Kinsey S G, Bailey M T et al. The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. Physiol. Behav 2008; 93 (3): 628–636.

- Kirstin Aschbacher , Aoife O'Donovan, Owen M. Wolkowitz, Firdaus S. Dhabhar, Yali Su , Elissa Epel. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 2013; 38 (9): 1698–1708.
- Koepke JP, DiBona GF. Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during.
- Kusnecov A W and Rabin B S. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *Journal of Neuroimmunology* 1993; 44: 33-42.
- Kusnecov A W and Rabin B S. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *Journal of Neuroimmunology* 1993; 44: 33-42.

L

- Lambrecht BNM. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* 2001; 2: 133–8.
- Larsen, P.R. (1972). Triiodothyronine: Review of Recent Studies of in Physiology and Pathophysiology in Man. *Metabolism*, 21, 1073-1092.
- Lofberg E, Gutierrez A, Wernerman J, Anderstam B, Mitch WE, Price SR, Bergstrom J, Alvestrand A. Effects of high doses of glucocorticoids on free

amino acids, ribosomes and protein turnover in human muscle. *Eur J Clin Invest* 2002 ; 32,345-53.

- LeMay, L.G., Vander, A.J., et al., 1990. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol. Behav.* 47 (5), 957–961.
- Liu Y-L, Hui B, Chi S-Met al. The effect of compound nutrients on stress-induced changes in serum IL-2, IL-6 and TNF- α levels in rats. *Cytokine* 2007; 37:14–21.
- Langer, P., Foldes, O., Kvetnansky, R., Culman, J., Torda, T., El Daher, F., (1983a), Pituitary-thyroid function during acute immobilization stress in rats. *Exp. Clin. Endocrinol*, 82, 51-60.
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between "mental stress" and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 1984; 120: 273-281.
- Larrère R. Justifications éthiques des préoccupations concernant le bien-être animal. *INRA Prod. Anim* 2007 ; 20, 11-17.
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between mental stress and baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *J Hypertens Suppl* 1983; 1: 68-70.

- Lundin S, Thorén P. Renal function and sympathetic activity during mental stress in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 115-124.

M

- Marder M, Viola H, Wasowski C, Fernández S, Medina JH, Paladini AC. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. *Pharmacol Biochem Behav* 2003; 75: 737–745.
- Maridonneau-Parini I, Braquet P, and Garay R P. “Heterogeneous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells,” *Pharmacological Research Communications* 1986; 18 (1): 61–72.
- Moynihan J, Brenner, G Koota D et al. The effects of handling on antibody production, mitogen responses, spleen cell number, and lymphocyte subpopulations. *Life Sci* 1990;46:1937-1944.
- Mason J W, Wool M S F, Wherry F E et al. Plasma growth hormone response to avoidance sessions in the monkey. *Psychosomatic Med* 1968; 30:760-773.
- Murphy S J, Smith P, Shaivitz A B et al. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. *Contemp Top Lab AnimSci* 2001; 40:9-12.
- Mavissakalian M. The placebo effect in agoraphobia. *J. Nerv. Ment* 1987; 175, 95–99.

- Moynihan J A, Ader R, Grotta L J, Schachtman T R, Cohen N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 1990; 4: 1-12.
- Munck A, Guyre P M and Holbrook N J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews* 1984; 5: 25- 44.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S & Veissier I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav* 2007; 92, 317-339.
- Merlot E. Modulation de la production de cytokines par l'environnement social et susceptibilité aux infections. Thèse de doctorat. Institut national agronomique. paris-grignon. 2003.
- Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A. A., Muraille, E., Van Mechelen, M., Urbain, J. and Leo, O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *European Journal of Immunology*, 1995, 25, 2818-2824.

N

- Nandakumar N, Balasubramanian MP. Hesperidin a citrus bio-flavonoid modulates hepatic biotransformation enzymes and enhances intrinsic antioxidants in experimental breast cancer rats challenged with 7, 12-dimethylbenz (a) anthra-cene. *J Exp Ther Oncol* 2012; 9(4): 321-35.

- Nessaibia Issam, Tahraoui Abdelkrim. Méthode d'administration et impacte sur l'efficacité de l'hespéridine (French edition). Editions universitaires europeennes EUE 2015; ISBN: 9783841663696.
- Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* 2006; 136: 404–408.

O

- O'Connor K A, Johnson J D, Hammack S E, Brooks L M , Spencer R L , Watkins L R and Maier S. F. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psych neuroendocrinology* 2003; 28: 481-500.
- Osko, J. 1996. Liberation of thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine in the controllable and uncontrollable stress and after administration of naloxone in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 47 (2), 303-31.
- Ottoni, E B. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers* 2000; 32 (3): 446-449.

P

- Panksepp J, Burgdorf J. Laughing rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav* 2003; 79: 533– 547.

- Patin V, Lordi B, Vincent A, Caston J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2005; 160:265–74.
- Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, Camp RM, Gabella KM, Johnson JD. Rat strain differences in restraint stress- induced brain cytokines. *Neuroscience* 2011; 188:48-54.
- Pollard, J., Basett, J.R., Cairncross, K.D. (1979), Plasma thyroid hormone and gluco- corticosteroid concentrations in the male rat following prolonged exposure to stress. *Aust. J. Biol. Sci*, 32, 237-242.
- Pekow C. Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Contemp. Top. Lab. Anim* 2005; 44: 41–45.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985; 14:149–67.
- Powell, N D., Bailey, M T et al. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav. Immun* 2009; 23 (2): 225–231.
- Parck H, Kim M-J, Chung J-H. Apoptotic effect of hesperidin through caspase 3 activation in humain colon cancer cells, SNU-C4 *phytomedicine*15:147-151.

Q

- Quan N, Avitsur R, Stark J. L , He L , Lai W, Dhabhar F S and Sheridan J F. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *Journal of Neuroimmunology* 2003; 137: 51-58.
- Qualy, J.M. and Westfall, T.C. (1988), Release of norepinephrine from the paraventricular hypothalamic nucleus of hypertensive rats, *Am. J. Physiol*, 251 , 993-1003.

R

- Rao TS, Asha MR, Ramesh BN , KS. Understanding nutrition, depression and mental illnesses. *Indian J Psychiatry* 2008;50 (2):77-82.
- Rafter D. Biochemical markers of anxiety and depression. *Psychiatry Res* 2001; 103, 93-96.
- Roberts R A, Soames A R, James N H et al. Dosing induced stress causes hepatocyte apoptosis in rats primed by the rodent non genotoxic hepatocarcinogen cyproterone acetate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 135:192-199.
- Rook, G. A. W. (2010), Glucocorticoids and immune function. *Bail. Clin. Endocrinol. Metab*, 13: 567 – 581.

- Roura – Mir, C. M., Catalf M., et al. (2010), Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur. J. Immunol*, 27, 3290 – 3302.
- Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:19–34.
- Rushen J. Changing concepts of farm animal welfare: bridging the gap between applied and basic research. *Appl Anim Behav Sci* 2003; 81 199-214.

S

- Sáenz JCB, Villagra OR, Trías JF. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and openfield test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res* 2006; 169:57–65.
- Servatius, R., Natelson, B., Moldow, R., Pogach, L., Brennan, F., Ottenweller, J. (2000), Persistent neuroendocrine changes in multiple hormonal axes after a single or repeated stressor exposures. *Stress*, 3, 263–274.
- Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:1387-404.

- Sherwin C M, Olsson, I.A.S. Housing conditions affect self-administration of anxiolytic by laboratory mice. *Anim. Welfare* 2004; 13: 33–38.
- Sonja B. Schleimer, Graham A.R. Johnston, Jasmine M. Henderson. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. *Journal of Neuroscience Methods* 2005; 146: 159–164.
- Selye H. *The stress of life*, 2d edition ed: Papermark Edition. 1976
- Stark J L , Avitsur R , Hunzeker J , Padgett D A , Sheridan, J F. Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. *Journal of Neuroimmunology* 2002; 124: 9-15.
- Stark J L, Avitsur R, Padgett D A, Campbell K A, Beck F M and Sheridan J F. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative Comparative Physiology* 2001; 280: 1799-1805.
- Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation* 2007 ; 115, 450–458.

- Stefanski V and Engler H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *Journal of Neuroimmunology* 1999; 94: 144-152.
- Stefanski V, Peschel A. and Reber S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *Journal of Neuroimmunology* 2003; 138: 17-24.
- Suarez J, Herrera MD, Marhuenda E. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydro-chalcone. *Phytomedicine* 1998; 5(6): 469-473.

T

- Takaki A, Huang Q H, et al. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *NeuroImmunoModulation* 1994; 1 (6): 335–342.
- Tempel DL, Leibowitz SF. Adrenal steroid receptors: interactions with brain neuropeptide systems in relation to nutrient intake and metabolism. *J Neuroendocrinol* 1994; 6,479-501.

- Turakulov, Y., Burikhanov, R., Pakitdinov, P., Myslitskaya, A. (1994), Influence of immobilization stress on the levels of thyroid hormones. *Neurosci. Behav. Physiol*, 24, 462-464.
- Trinder P. 1969. Cholesterol. *Annals Clinical Biochemistry* 16-24.
- Tannenbaum BM, Brindley DN, Tannenbaum GS, Dallman M F, McArthur MD, Meaney MJ. High-fat feeding alters both basal and stress-induced hypothalamic-pituitary- adrenal activity in the rat. *Am J Physiol* 1997; 273, E1168-77.
- Terao T, Nakamura J, Yoshimura R, Ohmori O, Takahashi N, Kojima H, Soeda S, Shinkai T, Nakano H, Okuno T. Relationship between serum cholesterol levels and metachloro-phenylpiperazine- induced cortisol responses in healthy men and women. *Psychiatry Research* 2000 ; 96, 167–173.

V

- Voehringer DW. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:945-50.
- Veissier I, Beaumont C & Lévy F. Les recherches sur le bien-être animal : buts, méthodologie et finalité. *INRA Prod. Anim* 2007 ; 20, 3-10.

- Vyas A, Mitra R, Rao BSS, Chattarji S. Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci* 2002 ; 22, 6810–8.
- Vevera J, Zukov I, Morcine T, Papezova H. Cholesterol concentrations in violent and non-violent women suicide attempters. *European Psychiatry* 2003 ; 18, 23–27.

W

- Wilckens T and De Rijk R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunology Today* 1997; 18: 418-424.
- Wolfle T. Laboratory animal technicians. Their role in stress reduction and human-companion animal bonding. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1985; 15: 449–454.
- Wood P G, Karol M H, Kusnecov A W , Rabin B S. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 1993: 7; 121-134.

Y

- Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008; 54:95–98.

- Yong L, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions. *Progress in Neurobiology* 2012 ; 98 ,145–165.
- Yehuda R. Post-traumatic stress disorder. *N. Engl. J. Med* 2002 ; 346, 108-114.

Z

- Zalcman S , Minkiewicz-Janda A, Richter M, Anisman H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 1988; 2: 254-266.
- Zhang ZQ, Julien C, Barrès C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv* 1996; 60: 23-30.
- Zwilling, B. S., Brown, D., Christner, R., Faris, M., Hilburger, M., McPeck, M., Van Epps, C. and Hartlaub, B. A. Differential effect of restraint stress on MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4, 330-338.
- Zwilling, B. S., Brown, D. H. and Pearl, D. Induction of major histocompatibility complex class II glycoproteins by interferon-gamma: attenuation of the effects of restraint stress. *Journal of Neuroimmunology*, 1992, 37, 115-122.

A decorative graphic on the right side of the page. It features three blue circles of varying sizes, each with a gradient from dark blue in the center to light blue on the outside. Two thin blue lines originate from the top left and extend towards the circles. One line passes through the top-left edge of the largest circle, and the other passes through the top-left edge of the middle circle. A third line starts from the top right and extends towards the bottom right, passing through the top-left edge of the largest circle at the bottom of the page.

ANNEXES

Laboratory environment and bio-medical experience: the impact of administration technique on the quality of immune-behavior data results in stress experience

Nessaibia Issam*, Tahraoui Abdelkrim, Chouba Ibtissem, Kaarar Narjess

Laboratoire de Neuro-endocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, Annaba, Algeria

Article Info



Article Type:

Original Article

Article History:

Received: 12 June 2015
 Revised: 12 Sep. 2015
 Accepted: 22 Sep. 2015
 ePublished: 28 Dec. 2015

Keywords:

Administration techniques
 Behavior and immunological disorders
 IL-6
 ACTH
 Air jet stress

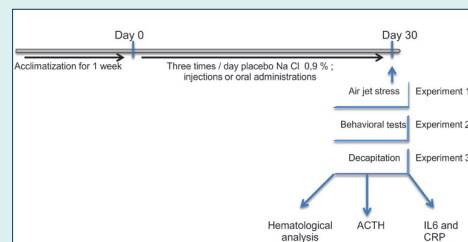
Abstract

Introduction: Often in an experiment, the control group and the intact group are not identified because most scientists neglect the fact that the sets of manipulation as technical administrations may be considered as an undesirable stress on the clarity of the data obtained from a scientific research specifically if it focuses on studying the effects of stress.

Methods: This study was conducted in two parts using 40 male Wistar rats. The first part aimed to treat a group of rats by repeated injections i.p route (1 mL/kg) of placebo or NaCl (0.9%) and the other by direct oral administration of NaCl (0.9%). Both groups spent 1 h of jet air stress with stressed group. Our objective was to consider the effects that these manipulations would have on the validity of behavioral results (the elevated plus maze test, the open field, the light/dark box test) and immune data (immune cell count) during this stress experience. The second part was devoted to the measurement of ACTH, IL6, and CRP in these experimental groups.

Results: Unlike oral administration, repeated intra-peritoneal injections cause a significant increase of plasma obtained levels of the adrenocorticotropin hormone (ACTH), interleukin-6 (IL-6) and the C-reactive protein (CRP) using injections of placebo: NaCl 0.9% (1 mL/kg) and it may have side effect on significant immune and behavioral alterations data quality induced by 1 h of air jet in the animal's cage identified by the leukocyte formula and behavioral tests.

Conclusion: In an experimental protocol conducted on animal models, it is essential to opt for painless techniques such as oral administration instead of painful injections to avoid confusion at the behavioral and immunological results from biomedical experiments specifically one that focuses on the stress study.



Introduction

Homeostasis involves complex interactions between the immune-endocrine system, which is essential for brain functions regulation such as emotion and cognition.¹ External aggressor often appears to change the equilibrium state and is generally associated with pro-inflammatory immune responses due to the activation of the corticotropic axis (HPA) to modulate the resources of the organism against an agent unknown to the central nervous system (CNS) as it presents itself as a stimulus with sufficient intensity capable of activating pain centers.^{2,3}

The responses an animal gives to adverse or stressful stimuli, called stressors, leads to general adaptation syndrome controlled through the hypothalamus-pituitary-adrenal

(HPA). The first response which occurs in seconds is the release of catecholamines. This first response is responsible for the increase in blood pressure, heart rate and plasma concentration of free fatty acids and glucose. In parallel, the hypothalamus of activation leads to the secretion of steroid-releasing hormone or CRH (41 amino acid residues) in the hypothalamic-pituitary portal system. The pituitary responds to the release of CRH secretion by adenocorticotropin hormone or ACTH. The second wave of the answer involves the steroid hormones. It develops in a few minutes. The release of glucocorticoids from the adrenal ACTH is stimulated, while the secretion of sex steroids by the gonads decreases. These responses are controlled largely through the HPA axis and secretion of



*Corresponding author: Nessaibia Issam, Email: issamland@yahoo.fr



© 2015 The Author(s). This work is published by BioImpacts as an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

corticotropin-releasing hormone (CRH) and corticotropin (ACTH).

Basically, placebo use in animals considered the control group of the experiment for comparison with the active group is required. The placebo administration is used to distinguish the effect caused by the administration itself from the treatment effect and to ensure scientific data analyses' proper execution. However, pseudo-stress imposed by both animal handling and needle-associated repeated narcosis pain can have the opposite effect of an active treatment by triggering an identical physiological and behavioral response to a classic stressor. These advances have been drawn from many critics of placebo classical definitions an inactive substance without any pharmacological effects, thus showing the importance of considering the administration technique itself,^{4,5} especially regarding experimentation on rodents where the external social environment is a key factor in the approach with these animals.^{6,7} Indeed, the social experience is directly linked to the inflammatory process.⁸⁻¹⁰ In mouse and rat, social stressors such as injections are capable of altering the immune system functioning by causing changes of the level of cytokines IL-6 and TNF- α called inflammatory and lead to glucocorticoids resistance.^{11,12}

Therefore, handling and infection processes are likely to compromise the quality of blood numbering obtained results and behavioral test in any experimental protocol due to the negligence of choosing an administration technique that minimizes the anxiety state of the animal that is the subject of this study. We studied this effect by using two different administration techniques (intra-peritoneal injection and oral administration) of placebo NaCl to treat leukocyte and behavioral alterations caused by psychogenic stress (the air jet stress) in Wistar rats while trying to explain the results deviation by measuring the associated hormonal (ACTH) and immunity biomarkers (IL6, CRP).

Materials and methods

Species and housing

According to Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 80-23, 1996), forty Wistar rats weighting

between 230-250 g were purchased from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria) to carry out this protocol where they were housed in translucent cages and acclimated to the conditions including a constant light/dark cycle turned on at 07:30 am, 25°C. Rats had food and water to drink in ad libitum bottles.

Study protocol

Forty rats were put into four groups (N = 10). The T named group serves as the intact group (no NaCl administered and no stressed group) while the G group (NaCl oral administered + stress group) underwent one week training receiving 2 ml of 5% sugar solution directly from the syringe then treated temporarily with the IP group (NaCl injected + stress group) for a period of one month with the vehicle of NaCl 0.9% (1 mL/kg) or placebo three times a day by oral administration and intra-peritoneal injection for the IP group. The placebo treatment duration took one month before air jet stress application, which occurred simultaneously in the S group (stressed group). Recent advances in psychological trauma suggest exploring methods to prevent the onset of anxiety disorders up to 30 days before their apparitions take place.¹³

Air jet stress was chosen due to its recommendation by numerous scientific studies,¹⁴⁻²² and it is an emotional stressor consisting of creating a 1-h constant air pressure of 1 bar using a compressor equipped with a gauge in the rat cage through a side port. After the air jet stress session, the four groups' behavior was tested in elevated plus-maze, open space and LDB box. Rats decapitation occurred under mild anesthetic diethyl ether and the blood collection was carried out in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes to determine the lymphocytic composition. After 15 min of centrifugation, the serum is used for adrenocorticotropin hormone measurement (ACTH), interleukin-6 (IL-6), and C-reactive protein (CRP) levels (Fig. 1).

Treatment and experimental groups

The elevated plus maze test

This test is a cross maze with two open arms and closed

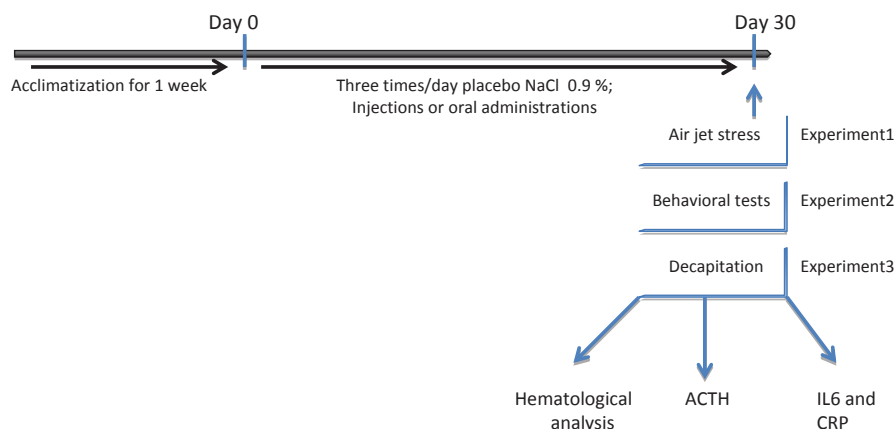


Fig. 1. Scheme of experimental procedure.

arms (50 × 10 cm), (50 × 10 × 45 cm). The apparatus is 50 cm above the ground.²³ The room where the test was performed is illuminated by suspended electric lamp of 65 W (175 cm above the maze center).²⁴ Each rat was separately placed in the device center, oriented towards an open arm. The exploration was measured for 5 min using the Ehto-Log 2.2™ software.²⁵ The experiment exploits the conflict in rodents between the fear of open spaces and the desire to explore a new environment.²⁶ The parameters measured in this test were spent time in open and closed arms. At the end of each session, we wiped the device with ethanol.

The open field

This test is considered as a key asset for the measurement of spontaneous exploratory locomotor activity in rodents while reflecting the characteristic fear of these animals from open spaces.²⁷ The dimensions of this test were selected based on the work of as a cube Plexiglas platform (40 cm 70 cm × 70 cm).²⁸ During 5 min the experimenter can measure the time spent in each area, the central area (35 cm²), and the peripheral area. Each session conducted semi-automatically by the EhtoLog 2.2™ software²⁵ while ensuring the removal of odors by wiping the test with ethanol after each use.

The light/dark box test (LDB)

Many behavioral paradigms based on different conflict situations, social interactions or explorations of new environments have been proposed to model animal anxiety. Costall et al have described (Biochem Behav Pharmacol. 32 (3):777-785, 1989)²⁹ a new model based on the aversive properties of an open field and on the comparison of exploratory activities in an illuminated and a dark compartment under the influence of anxiolytic substances.^{29,30} For the realization of this test, the device after the open field's floor was divided into two compartments: one of them was colored black and the other was left. A bright white light illuminated the transparent compartment. An opening, playing the role of a door, was created between two compartments (10 cm × 10 cm). Each rat was separately installed in the lighted compartment and its behavioral activities were recorded for 5 min and calculated using the EhtoLog 2.2™ software.²⁵

Immune cell count

A fully automated blood cell counter (PCE-210 model 2009, Japan) was used to measure the count of lymphocytes, monocytes, and granulocytes.

Biochemical assays

C-reactive protein

According to the protocol provided by the manufacturer (ZK044.L.R, The Binding Site Ltd, Birmingham, U.K.), the CRP serum level was measured by nephelometric methods. 3.51–12 mg/L as approximate measuring range is fixed when the sample dilution is 1/40. Moreover, the sensitivity limit was 0.44 mg/L at 1/5 sample dilution.

IL 6

The protocol followed was provided from the manufacturer standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kit (EK0412, Boster Biological Technology Ltd,

USA). The lowest limit of IL-6 detection levels was under 62.5–4000 pg/mL (The optical densities were read at 450 nm).

ACTH

The ACTH concentration was measured by enzyme-linked assay kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc. Burlingame, USA). All steps were followed as they were described in the protocol provided by the manufacturer.

Statistical data

The results of this work are transformed into means ± SEM using MINITAB 15 (Minitab Inc., USA) which aims to calculate the one-way analysis of variance (ANOVA). The value of $p < 0.05$ was regarded as significantly different (post hoc Dunnett test was used when a comparison is required).

Results

Anxious behavior in plus maze

Behavior in S, G, and IP groups increased significantly with the time spent in the maze closed arms ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, Fig. 2B) and very significant decrease in the open arms ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, Fig. 2A) was compared with the intact group. But no difference was noted between the S and G groups for the first and second parameter compared with the G group ($p < 0.001$).

Anxious behavior in the open field test

Our results show that the stressed S group and both IP and G groups spend more time in the peripheral area (Fig. 3A) and less time in the central area (Fig. 3B) and saves less locomotor activity (Fig. 3C) during the test compared with the intact groups. In contrast to the IP group ($p < 0.01$ Fig. 3A, $p < 0.001$ Fig. 3A and C), oral administration of the placebo in the G group does not seem to change the results obtained in the S group rats concerning the time spent in each of the areas of the test and the distance crossed (Fig. 3).

Anxious behavior in LDB test

In this test, S, G, and IP group rats spent significantly more time in the dark compartment ($p < 0.001$, Fig. 4A) and less time in the light compartment ($p < 0.001$, Fig. 4B) compared with the T group control rats. In contrast, the IP group ($p < 0.01$, $p < 0.001$) was significantly different from the G and S groups. Intra-peritoneal pretreatment does not improve the behavioral performances of IP rats in this test as demonstrated by the non-existence of significant differences between the latter and the S rats (Fig. 4).

Immune cell count

The results of lymphocyte formula show a highly significant increase in the total granulocytes in rats exposed to air jet stress ($p < 0.001$) compared with the intact group T. It seems to be the case that rats treated orally by the placebo were not significantly different from rats in the S group. The opposite of these results is witnessed in the reported rates of lymphocytes and monocytes that we found

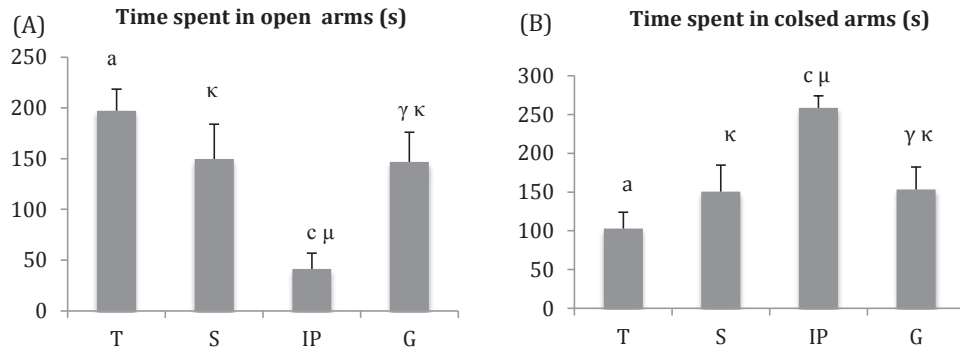


Fig. 2. The parameters in the elevated plus-maze test among rats pretreated with NaCl (placebo) via oral and intra-peritoneal routes and 1 h of exposure to the air jet stress. The results are expressed as the mean ± SEM. ^ap < 0.05 and ^κp < 0.001 vs. S; ^μp < 0.05 and ^γp < 0.001 IP vs. G; ^γp < 0.05 and ^μp < 0.001 vs. T.

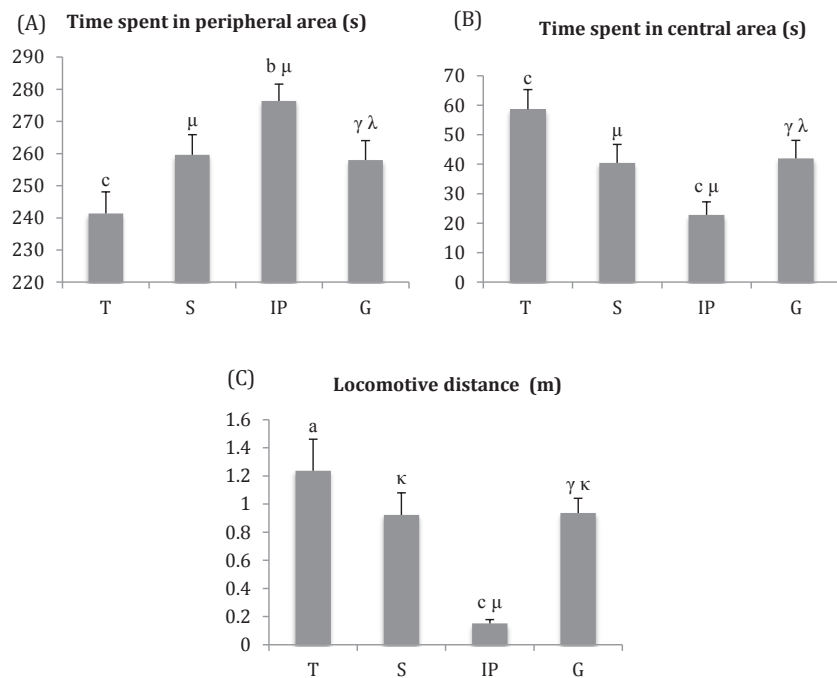


Fig. 3. The parameters in the open field test among rats pretreated with NaCl (placebo) by oral and intra-peritoneal routes and exposed for 1 h to air jet stress. The results are expressed as mean ± SEM. ^ap < 0.05 and ^bp < 0.01 and ^cp < 0.001 vs. S; ^μp < 0.001 IP vs. G; ^κp < 0.05 and ^γp < 0.01 and ^λp < 0.001 vs. T.

to be significantly suppressed in the S group ($p < 0.001$) compared with the intact group. Between the G and IP groups, there is a significant difference in the monocyte ($p < 0.01$), granulocyte ($p < 0.01$), and lymphocyte ($p < 0.001$) concentrations (Table 1).

ACTH, CRP and IL 6 plasma levels

The results after one month of intra-peritoneal injection show a significant increase in the plasma levels of ACTH ($p < 0.001$, Fig. 5A), CRP ($p < 0.05$, Fig. 5B) and IL-6 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, Fig. 5C) compared with groups T and G. However, there is no significant difference between the G group and the stressed group (Fig. 5).

Discussion

In this study, we investigated the ability of immune-endocrine mediations triggered after a negative contact with the laboratory animal on the quality of routine scientific stress experience data. The anxiogenic effect of the air jet stress is expressed in the elevated plus maze test by an augmentation past-time in the closed arms compared with the open one. These behavioral changes are probably due to damage in the regions controlling locomotor activity and anxiety. Indeed, sending a compressed air jet into the cage of the animal causes a psychological emotional stress that influences brain function by causing changes in multiple neural systems leading to neurodegenerative disorders.¹⁴⁻²² The significant difference between IP and G

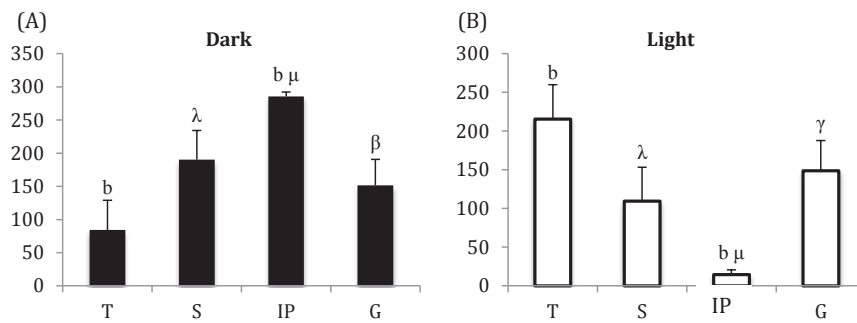


Fig. 4 The parameters of the light/dark box test among rats pretreated with NaCl (placebo) by oral and intra-peritoneal routes and exposed for 1 h to air jet stress. The results are expressed as mean \pm SEM. ^bp < 0.01 vs. S; ^βp < 0.01 and ^γp < 0.001 IP vs. G; ^λp < 0.01 and ^μp < 0.001 vs. T.

Table 1. Immune cell counts in male rats

Parameters	T	S	IP	G
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	11.56 \pm 0.51 ^b	8.35 \pm 0.60 ^λ	10.85 \pm 0.82 ^β	7.34 \pm 2.09 ^μ
LYM ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	8.34 \pm 0.23 ^c	3.70 \pm 0.41 ^μ	7.52 \pm 0.35 ^c	2.85 \pm 1.30 ^ν
MONO ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	0.52 \pm 0.07 ^c	0.28 \pm 0.03 ^μ	0.42 \pm 0.08 ^β	0.24 \pm 0.12 ^{β,μ}
GRAN ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	2.71 \pm 0.32 ^c	4.37 \pm 0.32 ^μ	2.91 \pm 0.58 ^b	4.22 \pm 0.79 ^{β,λ}

The results are expressed as mean \pm SEM. ^ap < 0.05 and ^bp < 0.01 and ^cp < 0.001 vs. S; ^βp < 0.01 and ^γp < 0.001 IP vs. G; ^λp < 0.01 and ^μp < 0.001 vs. T.

group in the open field test, which can be associated with the i.p treatment, is not due to the distinct route of administration technique but to the handling of animal pain and the repeated narcosis of needles, which inflict a physical and mental stress on the rats, especially when the injection procedure lasts several days throughout the protocol.³¹ Davis and Perusse assumed that the aversive experience of animals weakens their bond with experimenter and affects the quality of behavioral tests used in medical research.³² Stress caused by negative interactions with the experimenter would damage the learning and cognition abilities of the rat; thereby undermining the usefulness of the animals in scientific research and reducing clarity of the real results issued from the data.³³⁻³⁵ In opposition, a friendly link such as the administration of drugs directly from the syringe after habituation training of the procedure for one week with a 5% sweet solution, can reduce the stress response associated with experimental practices. This was previously reported in the behavior results (open field, elevated plus maze) in addition to the LDB test, which indicates that the injected group seems to be more anxious than the stressed group through most of the 5 min of the test in the dark compartment. These remarks submit that experimental model interactions with humans during the oral administration imitating the positive social interactions of the species can be used as alternative rewards that replace the aversive effects of the injections.³⁶ Secondly exposure to stress air jet caused a particular immune distribution; specifically, the lymphocyte levels were depressed in associated with an important augmentation in the count of granulocytes. In fact, scientific studies have shown that the exposure of rodents to important social

challenges, in this case to a 1-h episode of jet air, increases the granulocyte proportion and decreases the lymphocyte proportion.³⁷ It is possible that the lymphocytes accumulate in the bone marrow.³⁸ Moreover, psychological stress causes the high level of oxidative damage that can probably disrupt the balance between proliferation and blood cell apoptosis.³⁹⁻⁴⁵ The exact mechanism is not clear; however, researchers suspect the mediation of glucocorticoid-related stress.⁴⁶⁻⁴⁷ The main issue our results raise is why, unlike the outcomes of the behavioral tests, did the injected NaCl seem to better restore the values of white blood cells from damage from the oral air jet stress? Some studies suggest there is a specific window in which the development of specific response may be altered by stress. During a primary response, exposure to stress just before or during the 24 h following vaccination would be a critical period. Stress occurring later would have little or no effect.⁴⁸⁻⁵¹ From this perspective, we argue that the handling coupled to the injection procedure repeated for one month is a pseudo-chronic stressor that prevents an immune deviation when exposed to the air jet stress such as the one observed in the group administered placebo orally and wherein the lack of aversive contact with the rats makes them immunologically naive to the stressful session of the air jet following treatment. Neglecting such an immune-resistance process by researchers will likely decrease the quality of collected immunity data by overestimating the immune-pharmacological effectiveness of any product, due to non-consideration of the anxiety impact of the treatment technique on the psychological status of the experimental model.

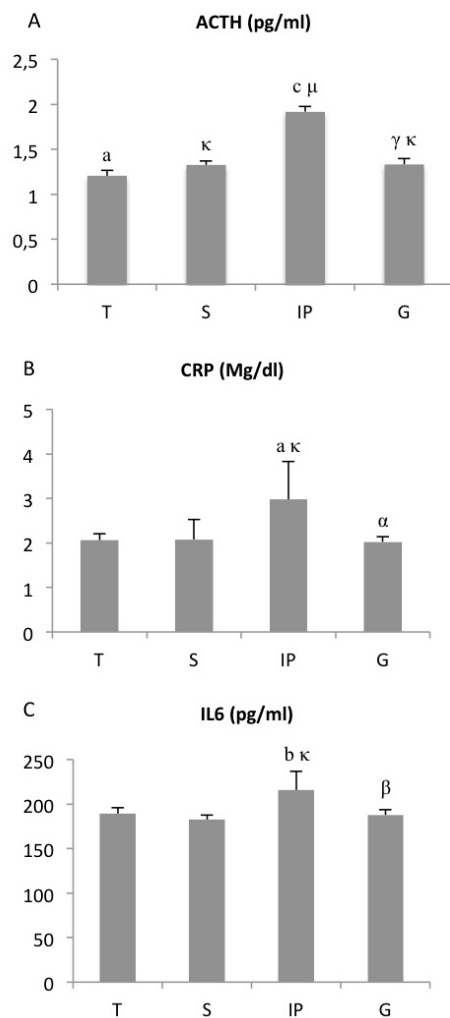


Fig. 5. Plasma levels of ACTH (A), CRP (B), and IL-6 (C) in rats treated with the placebo or vehicle (0.9% NaCl) by oral and intra-peritoneal routes. The results are expressed as the mean \pm SEM. ^a $p < 0.05$ and ^b $p < 0.01$ and ^c $p < 0.001$ vs. S; ^α $p < 0.05$ and ^β $p < 0.01$ and ^γ $p < 0.001$ IP vs G; ^κ $p < 0.05$ and ^μ $p < 0.001$ vs T.

The presence of pseudo stress associated with the intra-peritoneal injections preceding the application of the air jet may be the origin of the immune-resistance demonstrated in this protocol in the groups treated only with the vehicle (placebo). We recorded a typical stress response that involves an overproduction in the levels of ACTH and IL-6 at the end of thirty days of vehicle injection with NaCl. The significant associated production of CRP is due to the rate of IL-6 that generally alters the expression CRP, SAA, haptoglobin, fibrinogen, and orosomucoid (acute phase protein). Among these proteins, the CRP is recognized as the selection marker of the inflammatory response that increases the production of inflammatory cytokines and thus amplifies IL-6 rates.^{52,53}

The regulation of the immune response is induced by bi-directional inductions that involve the nervous endocrine and the immune system.^{54,55} The IL-6 secretion along with

Research Highlights

What is current knowledge?

✓ Friendly link between animals and experimenter can reduce the stress response related to experimental manipulations.

What is new here?

✓ Unlike oral administration, repeated intra-peritoneal injections cause important raise of the obtained plasma levels of the ACTH, IL6 and CRP.

✓ The presence of pseudo stress associated with the intra-peritoneal injections may be the origin of immune-resistance

✓ Pain of repeated narcosis compromise immune-behavioral data results.

other pro-inflammatory cytokines is activated precisely by depression, stressful events and experiences including injections. Additionally, IL-6 is a potential stimulator of the stress axis (HPA).⁵⁶ This is translated by the release of ACTH and glucocorticoids, major excitatory hormones. After a session of chronic injection or of physical stress, immune cell sensitivity to the glucocorticoids effect is decreased.^{57,58} Processes behind the resistance to glucocorticoids related stress are not fully elucidated.

The stress prevents GR migration from the cytoplasm to the nucleus;⁵⁹ it prevents the complex GR hormone from inhibiting gene transcription via the NF- κ B routes including proinflammatory cytokines. The physical activity associated with the experimental manipulation of the animals during the injection may be partly involved because physical exercise in humans decreases the sensitivity of blood lymphocytes to dexamethasone, a synthetic steroid.⁶⁰ Stress and the physical activity induce a release of IL-6 in to the plasma. Its potential role in the resistance induction was tested in vitro.⁶¹

Conclusion

To conclude, this work supports the consideration of non-invasive techniques such as oral administration that provides the animal with a positive contact link with the experimenter and avoids the physical aggressiveness of handling and the pain of repeated narcosis. As we demonstrated with the vehicle injection, a source of undesired pseudo-stress would compromise the data of behavioral tests by triggering a corticotropin response of ACTH and pro-inflammatory cytokines. In addition to air jet stress, it amplifies the animal's anxiety; this is probably due to the increase of IL-6 plasma levels accompanied by the rate of CRP known to affect the immune cell sensitivity to glucocorticoids. Consequently, we support, in an experimental protocol, the distinction between the control group receiving the vehicle (placebo) and the intact group to isolate the effect of the drug on the active group compared with the administration effect itself.

Ethical issues

The study protocol was carried out according to the NIH

revised Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 80–23, 1996).

Competing interests

Authors declare no competing interests.

References

- Claude J, Thurin JM. Stress, immunité et physiologie du système nerveux. *médecine sciences* **2002**; 11: 1160-1166. doi: 10.1051/medsci/200218111160
- Herbert T, Cohen S. Stress and immunity: a meta-analytic review. *Psychosom Med* **1993**;55: 364-79.
- Besedovsky H, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrinol* **1996**;17: 64-102. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.02.001
- Mavissakalian M. The placebo effect in agoraphobia. *J Nerv Ment* **1987**;175: 95-99.
- Coryell W, Noyes R. Placebo response in panic disorder. *Am J Psychiatry* **1988**;145: 1138-1140.
- Drago F, Nicolosi A, Micalè V, Lo Menzo G. Placebo affects the performance of rats in models of depression: is it a good control for behavioral experiments. *Eur Neuropsychopharmacol* **2001**;11: 209-213. doi: 10.1016/S0924-977X(01)00084-0
- Sonja B, Graham AR, Johnston, Jasmine M. Henderson. Novel oral drug administration in an animal model of neuroleptic therapy. *Journal of Neuroscience Methods* **2005**;146:159-164. doi: 10.1016/j.jneumeth.2005.02.004
- Bartolomucci A. Social stress, immune functions and disease in rodents. *Front Neuroendocrinol* **2007**; 28: 28-49. doi: 10.1016/j.yfrne.2007.02.001
- LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiol Behav* **1990**;47:957-961. doi: 10.1016/0031-9384(90)90024-X
- Takaki A, Huang QH, Somogyvári-Vigh A, Arimura A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *NeuroImmunoModulation* **1994**; 1: 335-342.
- Kinsey SG, Bailey MT, Sheridan JE, Padgett DA. The inflammatory response to social defeat is increased in older mice. *Physiol Behav* **2008**; 93: 628-636. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.11.003
- Powell ND, Bailey MT, Mays JW, Stiner-Jones LM, Hanke ML, Padgett DA. Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain Behav Immun* **2009**; 23: 225-231. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Rao TS, Asha MR, Ramesh BN. Understanding nutrition, depression and mental illnesses. *Indian J Psychiatry* **2008**; 50: 77-82. doi: 10.4103/0019-5545.42391
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between "mental stress" and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* **1984**;120: 273-281. doi: 10.1111/j.1748-1716.1982.tb07053.x
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between mental stress and baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *J Hypertens Suppl* **1983**;1: 68-70.
- Lundin S, Thorén P. Renal function and sympathetic activity during mental stress in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* **1987**;115:115-124. doi: 10.1111/j.1748-1716.1982.tb07053.x
- Koepke, JP, DiBona GE. Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during stress in conscious spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1985**; 7: 350-6. doi: 10.1161/01.HYP.7.3.350
- Julien C, Cerutti C, Kandza P, Barres C, Su D, Vincent M, et al. Cardiovascular response to emotional stress and spontaneous blood pressure variability in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1988**;15: 533-538.
- DiBona GE, Jones SY. Analysis of renal sympathetic nerve responses to stress. *Hypertension* **1995**; 25: 531-538. doi: 10.1161/01.HYP.25.4.531
- Zhang ZQ, Julien C, Barrès C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv* **1996**; 60:23-30. doi: 10.1016/0165-1838(96)00023-9
- Barres C, Cheng Y, Julien C. Steady-state and dynamic responses of renal sympathetic nerve activity to air-jet stress insinoarctic denervated rats. *Hypertension* **2004**;43: 629-635. doi: 10.1161/01.HYP.0000115384.01463.61
- Kanbar R, Oréa V, Barrès C, Julien C. Baroreflex control of renal sympathetic nerve activity during air-jet stress in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2007**; 292: 362-367. doi: 10.1152/ajpregu.00413.2006
- Patin V, Lordi B, Vincent A, Caston J. Effects of prenatal stress on anxiety and social interactions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* **2005**;2160: 265-74. doi: 10.1016/j.devbrainres.2005.09.010
- Estanislau C, Morito S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* **2005**;163: 70-7. doi: 10.1016/j.bbr.2005.04.003
- Otoni EB. EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation session. *Behav Res Methods Instrum Comput* **2000**;32: 446-449.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* **1985**;14:149-67. doi: 10.1016/0165-0270(85)90031-7
- Angrini M, Leslie JC, Shephard RA. Effects of propranolol, buspirone, pCPA, reserpine, and chlordiazepoxide on open-field behavior. *Pharmacol Biochem Behav* **1998**; 59: 387-97. doi: 10.1016/S0091-3057(97)00457-7
- Sáenz JC, Villagra OR, Trías JF. Factor analysis of forced swimming test, sucrose preference test and open field test on enriched, social and isolated reared rats. *Behav Brain Res* **2006**; 169: 57-65. doi: 10.1016/j.bbr.2005.12.001
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* **1989**; 32: 777-785. doi: 10.1016/0091-3057(89)90033-6
- Arrant AE, Jemal H, Kuhn CM. Adolescent male rats are less sensitive than adults to the anxiogenic and serotonin-releasing effects of fenflurmine. *Neuropharmacology* **2013**; 65: 231-22. doi: 10.1016/j.neuropharm
- Gartner K, Buttner D, Dohler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I. Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals* **1980**; 14: 267-74. doi: 10.1258/002367780780937454
- Davis H, Perusse R. Human-based social interaction can reward a rat's behavior. *Anim Learn Behav* **1988**; 16: 89-92. doi: 10.3758/BF03210783
- Wolfe T. Laboratory animal technicians: Their role in stress reduction and human-companion animal bonding. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **1985**; 15:449-454.
- Sherwin CM, Olsson IA. Behaviour of laboratory mice in different housing conditions when allowed to self-administer an anxiolytic. *Lab Anim* **2006**; 04: 392-399. doi: 10.1258/002367706778476389
- Pekow C. Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim* **2005**;44: 41-45.
- Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* **2001**;72: 167-173. doi: 10.1016/S0031-9384(00)00411-X
- Stefanski V, Engler H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J Neuroimmunol* **1999**;94:144-152. doi: 10.1016/S0165-5728(98)00242-2
- Stefanski V, Peschel A, Reber S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *J Neuroimmunol* **2003**; 1138: 17- 24. doi: 10.1016/S0165-5728(03)00076-6
- Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H. Depressive state relates to

- female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem Biophys Res Commun* **2003**; 311: 1014-1018. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.10.105
40. Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, et al. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS* **2004**;101:17312-17315. doi: 10.1073/pnas.0407162101
41. Forlenza MJ, Miller GE. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom Med* **2006**; 68: 1-7. doi: 10.1097/01.psy.0000195780.37277.2a
42. Gidron Y, Russ K, Tissarchondou H, Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review. *Biol Psychol* **2006**;72: 291-304. doi: 10.1016/j.biopsycho.2005.11.011
43. Voehringer DW. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptose sensitivity. *Free Rad Biol Med* **1999**; 27: 945-50. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00174-4
44. Irani K. Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* **2000**; 87:179-183. doi: 10.1161/01.RES.87.3.179
45. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Med* **2000**; 28: 1387-404. doi: 10.1016/S0891-5849(00)00224-0
46. Radak Z, Chung HY, Goto S. Exercise and hormesis: oxidative stress-related adaptation for successful aging. *Biogerontology* **2005**; 6:71-75. doi: 10.1007/s10522-004-7386-7
47. Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeier H. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem* **2010**; 344: 221-230. doi: 10.1007/s11010-010-0546-y
48. Kusnecov AW, Rabin BS. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *J Neuroimmunol* **1993**; 44: 33-42. doi: 10.1016/0165-5728(93)90265-Z
49. Moynihan JA, Ader R, Grotta LJ, Schachtman TR, Cohen N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain Behavior and Immunity* **1999**; 4: 1-12. doi: 10.1016/0889-1591(90)90001-7
50. Wood PG, Karol MH, Kusnecov AW, Rabin BS. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain Behavior and Immunity* **1993**; 7:121-134. doi: 10.1006/brbi.1993.1014
51. Zalcman S, Minkiewicz-Janda A, Richter M, Anisman H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain Behavior and Immunity* **1988**;2: 254-266. doi: 10.1016/0889-1591(88)90027-X
52. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **1999**; 340: 448-54. doi: 10.1056/NEJM199902113400607
53. Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J, et al. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* **1995**; 102: 217-223.
54. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* **1994**; 15: 504-11. doi: 10.1016/0167-5699(94)90205-4
55. Lambrecht BN. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir Res* **2001**; 2: 133-8. doi: 10.1186/rr49
56. Liu YL, Hui B, Chi SM, Fan R, Wang YM, Ma XL, et al. The effect of compound nutrients on stress-induced changes in serum IL-2, IL-6 and TNF- α levels in rats. *Cytokine* **2007**; 37:14-21. doi: 10.1016/j.cyto.2007.02.009
57. O'Connor KA, Johnson JD, Hammack SE, Brooks L M, Spencer RL, Watkins LR, et al. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology* **2003**; 28: 481-500. doi: 10.1016/S0306-4530(02)00035-5
58. Stark JL, Avitsur R, Padgett DA, Campbell KA, Beck FM, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001; 280(6): R1799-805.
59. Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Lai W, Dhabhar FS, et al. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *J Neuroimmunol* **2003**; 137: 51-58. doi: 10.1016/S0165-5728(03)00042-0
60. Derijk R, Petrides J, Deuster P, Gold PW, Sternberg EM. Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**;81: 228-235. doi: 10.1210/jcem.81.1.8550757
61. Stark JL, Avitsur R, Hunzeker J, Padgett DA, Sheridan JF. Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. *J Neuroimmunol* **2002**;124 9-15. doi: 10.1016/S0165-5728(02)00004-8

16. Estanislau C, Morito S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2005; 163:70–7
17. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:19–34.
18. Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* 2006; 136: 404–408.
19. Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008; 54:95–98.
20. Wolfle T. Laboratory animal technicians. Their role in stress reduction and human-companion animal bonding. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1985; 15: 449–454.
21. Sherwin C.M, Olsson I.A.S. Housing conditions affect self-administration of anxiolytic by laboratory mice. *Anim. Welfare* 2004; 13: 33–38.
22. Pekow C. Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Contemp. Top. Lab. Anim.* 2005; 44: 41–45.
23. Panksepp J, Burgdorf J. Laughing rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav* 2003; 79: 533–547.
24. Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol. Behav* 2001; 72: 167–173.
25. Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H. Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 311: 1014-1018.
26. Epel E.S, Blackburn E.H, Lin J, Dhabhar F.S, Adler N.E, Morrow J.D, Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS* 2004; 101: 17312-17315.
27. Forlenza M.J, Miller G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom. Med* 2006; 68: 1-7.
28. Gidron Y, Russ K, Tissarchondou H, Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical re-view. *Biol. Psychol* 2006; 72: 291-304.
29. Voehringer DW. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:945-50.
30. Irani K. Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signalling. *Circ Res* 2000; 87:179-83.
31. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:1387-404.
32. Deng W, Fang X, Wu J. Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiat Phys Chem* 1997; 50(3): 271-6.
33. Suarez J, Herrera MD, Marhuenda E. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine* 1998; 5(6): 469-473.
34. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as anti-oxidants. *J Am Chem Soc* 1994; 116(11): 4846-51.
35. Nandakumar N, Balasubramanian MP. Hesperidin a citrus bio-flavonoid modulates hepatic biotransformation enzymes and enhances intrinsic antioxidants in experimental breast cancer rats challenged with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *J Exp Ther Oncol* 2012; 9(4): 321-35.
36. Cai L, Li R, Wu QQ, Wu TN. Effect of hesperidin on behavior and HPA axis of rat model of chronic stress-induced depression. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2013; 38 (2): 229-33.
37. Kusnecov A. W and Rabin B. S. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *Journal of Neuroimmunology* 1993; 44: 33-42.
38. Moynihan J. A, Ader R, Grota L. J, Schachtman T. R Cohen N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 1990; 4: 1-12.
39. Wood P. G, Karol M. H, Kusnecov A. W, Rabin B. S. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 1993; 7: 121-134.
40. Zalcman S, Minkiewicz-Janda A, Richter M, Anisman H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 1988; 2: 254-266.
41. Reinhardt V and Reinhardt A. Blood collection procedure of laboratory primates: a neglected variable in biomedical research. *J Appl Anim. Welfare Sci* 2000; 3:321-333.



ISSN: 0976-3031

Available Online at <http://www.recentscientific.com>

International Journal of Recent Scientific Research
Vol. 5, Issue, 12, pp.2247-2249, December, 2014

**International Journal
of Recent Scientific
Research**

RESEARCH ARTICLE

THE USE OF NATURAL ADMINISTRATION TECHNIQUE AS AN ALTERNATIVE TO OROGASTRIC GAVAGE PREVENTS UNDESIRABLE CHANGES IN THE RESULTS OF ACTH PLASMA AND ANTIBODIES DUE TO STRESS IN RATS

¹*Nessaibia Issam, ²Chouba Ibtissem, ³Hamri Ahlem and ⁴Tahraoui Abdelkrim

^{1,2,3,4}Laboratoire De Neuro-Endocrinologie Appliquée, Département De Biologie, Université Badjimokhtar, Bp 12, 23000, Annaba, Algeria

ARTICLE INFO

Article History:

Received 6th, November, 2014
Received in revised form 16th, November, 2014
Accepted 8th, December, 2014
Published online 28th, December, 2014

Key words:

Orogastric gavage, Natural administration, placebo, ACTH, antibodies, stress.

INTRODUCTION

Virtually, all animals are exposed to a wide range of potential stressors during their lifetimes. These stressors can be a result of environmental perturbations or social interactions. Regardless of the type of stressor, prolonged exposure to stress can have profound, long-lasting effects on physiology and behavior (Stefanski *et al.*, 1998). These changes are mediated by specific neuroendocrine mechanisms, including the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis (Sgoifo *et al.*, 1996). Increased HPA activity in response to stress, and the resultant release of adrenal glucocorticoids, can exert substantial effects on physiology, including brain remodeling (Stefanski *et al.*, 1998; McEwen *et al.*, 1998; McEwen *et al.*, 2000; Fuchset *et al.*, 2002) and immune modulation (Fleshner *et al.*, 1989; Avitsuret *et al.*, 2002).

Orogastric gavage is a common laboratory method in toxicology and pharmacokinetic studies, where it is commonly used for daily dosing of rats, mice, rabbits, and monkeys (Murphy *et al.*, 2001; Nickerson *et al.*, 1994; Alban *et al.*, 2001). Gavage involves the physical stresses of handling and restraint, insertion of a rigid metal or flexible plastic tube from mouth to stomach, and stomach distension. Other potential stressors include possible elevations of heart rate, blood pressure, and glucocorticoid concentrations that persist for 30 to 60 min or more following the event, suggesting that despite their routine use in laboratory studies, these procedures are acutely stressful for animals (Brown *et al.*, 1974).

Sharp *et al.* noted, Care should be exercised in dismissing a procedure as non-stressful just because it is simple or routine. Being present when these procedures are being conducted on other animals also significantly elevates physiologic parameters indicative of stress, at least in rats, mice and

ABSTRACT

Orogastric gavage is a common laboratory method in toxicology and pharmacokinetic studies, where it is commonly used for daily dosing of rats, mice, rabbits, and monkeys. This work performed on Wistar rats showed that the repeated use of this technique, unlike the natural administration directly from the syringe to be treated with a dose of 1 ml/kg of the placebo (NaCl 0.9%), triggers in rats undesirable stress for the success of the experiment expressed by a significant increase in ACTH levels that cause immuno suppression of detected antibodies.

© Copy Right, IJRSR, 2014, Academic Journals. All rights reserved.

monkeys. Both rats and mice produce and respond to signals and odors associated with stressful laboratory procedures (Foxet *et al.*, 1986; Beynenet *et al.*, 1992).

Because pain and fear, and resulting stress and distress, may introduce confounding variability to scientific data, these states have the potential to lessen the reliability of animal studies. Scientists are well aware of this, and some have warned of the hazards of disregarding stress effects, including those arising from laboratory routines as the orogastric gavage (Masonet *et al.*, 1968; Robertset *et al.*, 1995; Brenneret *et al.*, 1990). Despite this, the negative effects of pain, stress and distress and their influence on study outcome are either not reported or underreported in published scientific papers (Reinhardt *et al.*, 2000). What is clear, however, are that handling effects can significantly alter an animal's immune status either enhancing or compromising and could have important methodological implications (Moynihanet *et al.*, 1990).

In order to elucidate this aspect, this work focuses on the existing complex between the gavage technique and plasma distribution of antibodies and of ACTH which aims to show the negative impact of such technology on the quality of the obtained immune results and the importance of maintaining a positive contact through the development of passive administration techniques on rats. This is the case of natural administration directly from the syringe which eliminates every stress that effects scientific experimentation.

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing

Twenty-four (24) male Wistar rats obtained from Pasteur Institute (Algiers, Algeria) were housed in transparent cages at a constant temperature (23 ± 1 °C) with a 12 h/12 h light/dark cycle (lights on at 07:30 a.m.). Rats had access to standard

* Corresponding author: **Nessaibia Issam**

Laboratoire De Neuro-Endocrinologie Appliquée, Département De Biologie, Université Badjimokhtar, Bp 12, 23000, Annaba,

rodents chow and tap water ad libitum. Weighing 230–250 g at the beginning of the experiment, the animals were weighed daily before any other experimental procedure in order to calculate the 24 h-body weight gains. The study protocol was carried out according to the NIH revised Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 80–23, 1996).

Study protocol

The twenty-four rats were divided into three groups of eight (n = 8). The control group and naturally administered one underwent a week of training receiving 2 ml of 5% sugar solution directly from the syringe, then treated temporarily with the gavage group for a period of one month with the vehicle of NaCl 0.9% (1 ml/kg) or placebo three times a day by direct administration and gavage using dry gavage needle for the gavage group. The rats were then sacrificed by decapitation under mild anesthetic diethyl ether and the blood collection was carried out in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes. While 3 ml of blood was transferred into a plain tube and allowed to clot.

Blood containing plain tubes were centrifuged for 15 minutes in cold centrifuge machine (Model 5810R; Eppendorf, Germany). Centrifuge temperature was adjusted at 4°C and speed at 4000 rpm. After cold centrifugation, serum was pipetted out. Approximately 1.5 ml of serum was obtained from each blood sample, transferred to serum tubes (Eppendorf, Germany). Estimation of immunoglobulin A, E, G and M levels were done by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using immunoperoxidase assay kits of Immunology Consultants Laboratory Inc. U.S.A. (Caplan *et al*, 1979). To measure the plasma levels of the ACTH hormone, ELISA tests were performed as directed by the manufacturers. The kit for ACTH assay was obtained from Phoenix Pharmaceuticals Inc. Burlingame, USA.

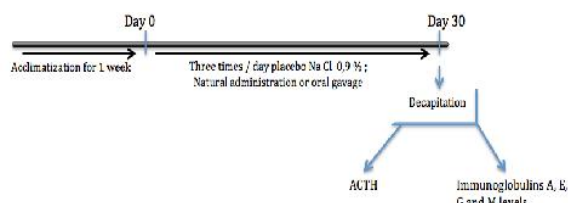


Figure 1 Scheme of experimental procedure

Statistical analysis of results

All data are expressed as the mean ± SEM (Standard Error of the Mean). All groups showed normal distributions, so a parametric statistical method; one way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc test, was used for multiple comparisons. The value of p < 0.05 or less was considered as the significant difference. Data were analyzed using MINITAB (Minitab® 13.31).

Table 1 Comparison of serum immunoglobulin levels between rats treated with placebo and healthy control group.

Groups	Control	Gavage	Natural administration
IgA (ng/ml)	107.06 ± 13.81	82.35 ± 7.31 ^b	101.66 ± 16.9 ^β
IgE (ng/ml)	21.11 ± 0.95	17.46 ± 0.65 ^b	20.95 ± 2.35 ^β
IgM (ng/ml)	748.48 ± 44.36	678.68 ± 11.65 ^b	744.33 ± 27.78 ^β
IgG (ng/ml)	620 ± 40.31	562 ± 9.15 ^b	616 ± 21.90 ^β

RESULTS

The results are expressed as mean ± SEM. ^b P < 0.01 vs control; ^β P < 0.01 gavage vs natural administration.

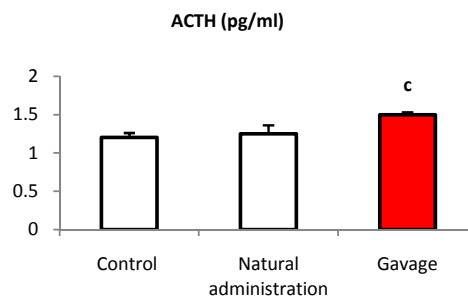


Figure 2 Plasma levels of ACTH in rats treated with placebo (0.9% NaCl) by gavage and natural routes. The results are expressed as mean ± SEM. ^c P < 0.001 vs control; ^γ P < 0.001 gavage vs natural administration.

The comparison of immunoglobulin levels between the three groups has been presented in Table 1. Immunoglobulin levels were significantly decreased in rats exposed to chronic gavage compared to healthy rats and the natural administration group (p < 0.01). The results of one month's gavage show a significant increase in plasma level of ACTH compared to control and natural administration group (p < 0.001).

DISCUSSION

Stress induced by highly invasive procedures used in some animal studies is well recognized by regulatory authorities and Institutional Animal Care and Use Committees. Animals used in laboratory research and testing are also regularly subjected to routine maintenance or monitoring procedures, such as personnel entering the animal housing room, cage movement and cleaning, body weight collection, physical examination, injections, and collection of blood or other tissues. Because these procedures may be considered incidental in nature, their effects on laboratory animal well-being may be over-looked by ethical review committees, whose task is to try to reduce the potential for animal pain and suffering.

This study performed on Wistar rats aims to demonstrate the nature of human contact influence with the experimental model on the clarity of immuno-endocrine results; Mainly ACTH and antibodies in the case of oral administration of placebo (0.9% NaCl). This choice specifically focused on the rates of blood antibodies is justified by the known complex between the Handling linked systematically to the gavage technique and the immune system response demonstrates evidence of both depressed and enhanced effects due to handling according to larger body of literature that reports various effects on immunity (e.g., tumor growth, susceptibility to infectious disease) in response to handling (Moynihan *et al*, 1990; Aarstad *et al*, 1992).

The significant decrease in plasma levels of antibodies obtained in our results in rats force-fed with placebo does not explain how Handling may affect the health and well-being of animals, particularly rats, used in laboratory research. What is clear, however, is that handling effects can significantly alter an animal's immune status either by enhancing or compromising, and could have important methodological implications. For this reason, the development of new techniques for passive administration, such as accustoming the animal to take its dose of treatment directly from the syringe, can be a very good alternative

to preserve the natural levels of antibodies. This was demonstrated in the results of the batch naturally given the NaCl 0.9%. Moreover, adopting such approach in an experimental procedure prevents the animal from the physical stress of gavage triggered by the restraint and insertion of a rigid metal in the mouth. This led to a rise in heartbeats, blood pressure and activation of the HPA axis reported in this study by a significant increase of ACTH levels in the blood of the force-fed group compared to the naturally administered group. According to (Brown *et al*, 1974), this phenomenon can persist 30 to 60 min after the event.

Other scientific works about rats administered water, Tween 80 (a non-toxic surfactant), and various food-grade oils, both the vehicle and the volume influenced stress responses (Brown *et al*, 2000). Despite pre-study acclimation to daily restraint and insertion of a dry gavage needle, rats administered corn, sesame, soybean, or peanut oil as vehicles demonstrated a dose-dependent increase in serum corticosterone levels over a 24-h period. Besides this, the immune system is a complex network of cells, proteins, tissues, and organs that work together to protect the body against infectious diseases or other insults. Stress including that resulting from gastric gavage has been documented to produce a profound effect on the immune system. It influences hormones that bind specific receptors on the membrane or in the cytoplasm of cells of the immune system, including various cells that participate in the production of antibodies. Experimental studies report heterogeneous findings in relation to stress and the immune mechanisms (Hitti *et al*, 2008). Long-term stress can have a detrimental effect on the body that may lead to serious disease and debilitation (Porterfield *et al*, 2011).

Stress can alter antibody production which corroborates perfectly the results obtained in this process protocol where chronic gavage in rats caused an activation of the stress axis (HPA), which results in an increased release of ACTH. These ones can be the cause of significant depression of the antibodies in these rats. On the contrary, keeping a soft and friendly contact with these animals by administering the vehicle directly reduces the negative complications associated with stress. Furthermore, preventing depression of antibodies means to maintain the results at the same state as the control rats. This fact adds more credibility to the results of a scientific experiment.

Finally, this work has shown the influence of chronic gavage and repeated Handling on the rates of ACTH and antibodies. This affects adversely the data in a scientific experiment, in which the importance of the approaches using passive techniques, and including natural Administration to prevent the generation of unwanted stress.

References

Aarstad H J and Seljelid R 1992. Effects of stress on the growth of a fibrosarcoma in nu/nu and conventional mice. *Scand J Immunol* 1992; 35:209-215.

Alban L P J, Dahl A K, Hansen *et al*. The welfare impact of increased gavaging doses in rats. *Anim. Welfare* 2001; 10: 303-314.

Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Sheridan JF. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J Neuroimmunol* 2002; 132:66-71.

Beynen A C. Communication between rats of experiment-induced stress and its impact on experimental results. *Anim*

Welfare 1992; 1:153-159.

Brenner G J N, Cohen, Ader R *et al*. Increased pulmonary metastases and natural killer cell activity in mice following handling. *Life Sci* 1990; 47:1813-1819.

Brown A P, Dinger N and Levine B S. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab AnimSci* 2000; 39 (1): 17-21.

Brown G M and Martin J B. Corticosterone, prolactin, and growth hormone responses to handling and new environment in the rat. *Psychosom Med* 1974; 36:241-247.

Caplan RD, Cobb S, French J R. White collar work load and cortisol: disruption of a circadian rhythm by job stress? *J Psychosom Res* 1979; 23:181-92.

Fleshner M, Laudenslager ML, Simons L, Maier SF. Reduced serum antibodies associated with social defeat in rats. *PhysiolBehav* 1989; 45:1183-7.

Fox M W. Laboratory animal husbandry: ethology, welfare and experimental variables. State University of New York Press, Albany 1986.

Fuchs E, Flügge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals. *PharmacolBiochemBehav* 2002; 73:247-58.

Hitti M, Chang L. Chronic fatigue syndrome linked to hormone. *J ClinEndocrinolMetab* 2008; 22:326-30.

Mason J W, Wool M S F, Wherry F E *et al*. Plasma growth hormone response to avoidance sessions in the monkey. *Psychosomatic Med* 1968; 30:760-773.

McEwen BS. Protective and damaging effects of stress mediators. *New Engl J Med* 1998; 338:171-9.

McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 2000; 886:172-89.

Moyinhan J, Brenner, G Koota D *et al*. The effects of handling on antibody production, mitogen responses, spleen cell number, and lymphocyte subpopulations. *Life Sci* 1990; 46:1937-1944.

Murphy S J, Smith P, Shaivitz A B *et al*. The effect of brief halothane anesthesia during daily gavage on complications and body weight in rats. *Contemp Top Lab AnimSci* 2001; 40:9-12.

Nickerson D F, Weaver M L and Tse F L N. The effect of oral dose volume on the absorption of a highly and a poorly water soluble drug in the rat. *Biopharmaceutics Drug Dispos* 1994; 15: 419-429.

Porterfield VM, Zimomra ZR, Caldwell EA, Camp RM, Gabella KM, Johnson JD. Rat strain differences in restraint stress-induced brain cytokines. *Neuroscience* 2011; 188:48-54.

Reinhardt V and Reinhardt A. Blood collection procedure of laboratory primates: a neglected variable in biomedical research. *J Appl Anim. Welfare Sci* 2000; 3:321-333.

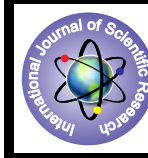
Roberts R A, Soames A R, James N H *et al*. Dosing induced stress causes hepatocyte apoptosis in rats primed by the rodent nongenotoxic hepatocarcinogen cyclopropane acetate. *ToxicolApplPharmacol* 1995; 135:192-199.

Sgoifo A, de Boer SF, Haller J, Koolhaas JM. Individual differences in plasma catecholamine and corticosterone stress responses of wild-type rats: relationship with aggression. *PhysiolBehav* 1996; 60:1403-7.

Sharp J L T, Zammit G, Azar T A *et al*. Stress-like responses to common procedures in individually and group-housed female rats. *Contemp Top Lab AnimSci* 2003; 42(1): 9-18.

Stefanski V. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subordinate males. *PhysiolBehav* 1998; 63:605-13.

EFFECTS OF CHRONIC HYPERTENSION CAUSED BY REPEATED EPISODES OF AIR JET STRESS ON THE PLASMA LEVELS OF TSH, T3 AND T4 IN WISTAR RATS



Biology

KEYWORDS : hypertension; air jet stress; thyroid hormones; rats

Nessaibia Issam*

Laboratoire de Neuro-endocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000, Annaba, Algeria. * Corresponding author

Chouba Ibtissem^a

Laboratoire de Neuro-endocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000, Annaba, Algeria.

Tahraoui Abdelkrim^a

Laboratoire de Neuro-endocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000, Annaba, Algeria.

ABSTRACT

Disruptions of hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in response to chronic crises of hypertension is relatively less known mainly regarding the defense mechanisms of the body facing a stressful external aggression and the repercussions caused by neuroendocrine mediation related to this axis. This study deals experimentally with a social deficit model on Wistar rats. This state of hypertension is caused by using chronic exposure to 1 bar 2 hours / day of air jet stress. The results show a significant increase in the TSH plasma and T3, T4 symptomatic of hyperthyroidism. This may be directly caused by the direct impact of hypertension on the activity of the para-ventricular hypothalamic nucleus (PVN) and the production of TRH, as well as a probable imbalance of immune rate Th1 / Th2 towards a Th2 hormonal profile triggered by the stress and consequently, the production of anti-TSH.

1. Introduction

In mammals, the hypothalamic-pituitary-thyroid HPT axis is controlled by neurons located within the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) that synthesize and release thyrotropin-releasing-hormone (TRH) into the median eminence. TRH stimulates the release of thyroid-stimulating hormone (TSH) from the anterior pituitary, and then TSH travels through the peripheral vasculature to stimulate thyroid hormone (TH) release (both T3 and T4) from the thyroid gland[1].

Several Studies have revealed that the thyroid hormones exert various effects on cardiovascular function[2]. Differing states of disease verify these influences[3]. Heart rate, stroke volume and contractile force, which are results of imbalance in enzymatic function and alterations in protein synthesis[4], decrease in hypothyroidism[5]. In hyperthyroidism, T3 dilates resistance arterioles, reducing systemic vascular resistance by 300-1000 dynes-cm⁻⁵. The decline in systemic vascular resistance stimulates renin release and sodium reabsorption, resulting in an expansion of blood volume by 5.5% and an increase in venous return to the heart [6]. Other potential cardiovascular consequences of hyperthyroidism include arterial arrhythmias[7], pulmonary hypertension [8], heart failure[9-10]. This evidence shows a significant association between thyroid hormones and cardiac function.

On the contrary, few are the studies that focus on the reverse impact that provoke cardiovascular disorders, including chronic hypertension, on the function of the thyroid. In this research, we consider a third element which is the environmental factor as one of the leading causes of hypertensive variations if exposed a long time to a stressor.

Humans and animals are constantly faced with various stressors in their lives, which can be both physiological and psychological[11]. Many studies demonstrate that stress of physiological or psychological origin results in considerable changes, either directly or indirectly, in serum level of many hormones including pituitary, adrenal and thyroid hormones [12].

Although Graves' disease has a well-known familial tendency, heredity does not explain everything[13,14,15]. A study of twins, who are not always concordant for the disease, suggests that genetic factors explain 79% of the incidence of the disease, while environmental factors are responsible for 21% of the cases[16].

Stressful events is able to disrupt the normal regulation of neuroendocrine axes, and although most research in this field has mainly pointed to the classic stress hormones: glucocorticoids and catecholamines[17], increasing evidences indicate that serum thyroid hormones (TH): T4, thyroxine and T3, triiodothyronine levels are also changed in response to chronic stress [18,19].

This work aims to study the interactions between these three elements: the environment, hypertension and thyroid hormones to determine the influences of hypertension provoked in a prolonged way on the activity of the TSH axis by sending an air jet; a simple method to induce stressful hypertensive episodes in animals [28].

2. Materials and methods

2.1. Animals and housing

20 adult male Wistar rats were obtained from Pasteur Institute (Algiers, Algeria) and individually housed in transparent cages in a temperature-controlled facility room (23± 1 °C). Rats were maintained on a 12-h/12-h light cycle (lights on at 07:30 a.m.) with access to standard rodent chow and tap water ad libitum. The experimental protocol was carried out according to the NIH revised Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (No. 80-23, 1996).

2.2. Study protocol

In this laboratory experimental study, male Wistar rats were randomly divided to control group (T), and groups exposed to 2 h/day of 10 rats in each group. The subjects were artificially exposed to constant air pressure of 1 bar using a compressor equipped with a gauge in the rat cage through a side port. At the end of 4 weeks, the rats were sacrificed by decapitation under mild anesthetic diethyl ether and blood samples were collected into the glass tubes without anticoagulant and were allowed to clot. It was centrifuged to obtain serum and stored at -20 °C until the assay. Serum TSH hormone levels were measured using TSH IRMA kit and total T3-total T4 hormone levels were measured using RIA kit (Diagnostic Products Corporation, LA, USA). All decapitations occurred at 13:00 h to minimize variations caused by diurnal rhythm [29].

2.3. Data analysis

The obtained results were statistically analyzed by using the student t-test according to the method of Snedecor and Cochran [20], P ≤ 0.05 considered significant while P ≤ 0.01 highly significant.

3. Results

The data are indicated as mean \pm SEM. P values are expressed in comparison with control group. The results indicated that serum TSH (fig 1 A) and T3, T4 (fig 1B and C) levels were significantly increased in rats exposed to air jet stress 2 h/day compared with control animals.

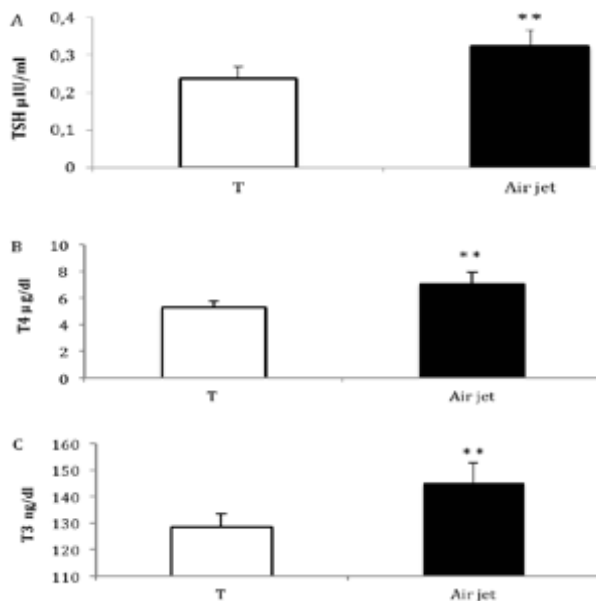


Figure 1. Serum concentrations of TSH and T3, T4 in control and rats exposed to air jet stress. The results are expressed as the mean \pm SEM. ** $P < 0.01$ T vs. Air jet.

4. Discussion

Functionally, the short-term benefits and advantages of a stress-induced decrease in thyroid hormone levels may reflect a conservation of energy and resources in an unpredictable environment [21]. However, stress-induced hormonal changes that are initially adaptive can become inappropriate or excessive and may lead to stress-related pathologies and disease [22, 23].

The use of air jet is a simple method to induce hypertension in rats because this technique simulates a collapse of its external environment which triggers a typical adaptive stress response including increased heart rate and arterial tension linked to the action of stress hormones. Apart from this psychological stressor aspect, the pressure difference caused by sending constantly their leads the body to trigger an internal pressure to compensate this pressure difference [24-29]. Chronic application of this stress mode has a completely original way about the effect of stress on the thyroid axis, because this interaction remains specific and depending on the type of stressor present in the environment, the exposure period, intensity and predictability, as well as the biological fluid, the time of hormonal sampling and ultimately the animal strains used [30-34].

For example, the levels of peripheral TH have been found to be decreased (Hohtari et al., 1987) [35] increased (Opstad, 1994) [36] or unchanged (Baumgartner et al., 1988) [37] after physical or acute psychological stress in humans. Controversial results were also observed in experimental models of stress. Therefore, immobilization stress has been shown to both increase (Turakulov et al., 1994) [38] and decrease (Cizza et al., 1996) [39] T4 and T3 levels. Exposure to foot shock stress generated a stress reaction that has also been associated with increases or decreases on T3 (triiodothyronine) or T4 (thyroxine) levels (Josko, 1996; Pollard et al., 1979) [32,40]. Regarding different stressors paradigms, while Servatius et al. (2000) have described decreased thyroid hormones after either one or three sessions of inescapable tail shock [41], found no changes in plasma TH levels af-

ter 14 days of cold swim stress [42]. [30,31] demonstrated a TH levels increase in plasma of rats after 2 min of immobilization stress. Curiously, TH sharply decreased later on. In chronic mild stress (CMS), increased serum TH levels were found in two different rat strains, with no parallel increase in the TSH, thyroid-stimulating hormone [43]. Changes in TSH levels also depend on the kind of stressful stimuli. While immobilization stress has been shown to increase serum TSH [39] other stressors, such as lipopolysaccharide (LPS) injection [44] or foot-shock [45] been shown to reduce TSH values.

Concerning the work of our stressor chosen to conduct this experiment, it appears that rats exposed chronically 2h/day to the jet air (4 weeks) develop an overproduction of TSH. This is probably due to hypertension triggering during the episodes of air jet stress, which triggers an abnormal neuroendocrine response including elevated circulating levels of thyrotropin (TSH) [46, 47]. The underlying cause for the inappropriate secretion of TSH in hypertensive rat is presently unknown. A defect involving thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons located in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus could be the primary cause of this abnormality. It is well established that paraventricular TRH neurons which are under thyroid hormone regulation [48,49] stimulate pituitary TSH synthesis and secretion [50-51]. Additionally, the PVN plays a key role in the development of hypertension [52]. Since the PVN is directly innervated by noradrenergic fibers from brain stem structures involved in relaying cardiovascular information [53-54] and also projects to neurons of the intermediolateral cell column of the spinal cord, the origin of preganglionic sympathetic neurons [55], it might be expected that peptidergic hypophysiotropic neurons located in the PVN are affected by an increased sympathetic tone in hypertensive rats. It has been proposed that excessive sympathetic nervous system activity may be involved in the onset of hypertension [56]. Thus, an increased noradrenergic input into the PVN could cause hypertension and at the same time chronically activate neurons encoding for TRH leading to hypersecretion of TSH.

The higher levels of TSH explain the systematic increase of thyroid hormones T3 and T4 in the hypertensive group compared with the control one. However, negative feedback regulation should curb the increased hypothalamic tone and normalize elevated TSH secretion from the pituitary gland. Since the development of hypertension air jet group is associated with a chronic hypersecretion of TSH [57], we hypothesized that negative feedback regulation at the pituitary and/or hypothalamic level may be impaired in these animals.

Furthermore, numerous studies have indicated a connection between stress and autoimmunity and that stress may trigger or worsen autoimmune disease, also demonstrated that, psychological and physiological stressors induce various immunological changes [58-61]. Exposed to stress as the air jet stress led to overproduction of the thyroid hormones T3, T4 and it is the most commonly caused of the development of Grave's disease, an autoimmune disease in which antibodies are produced which stimulate the thyroid to secrete excessive quantities of thyroid hormones [62]. Stress hormones resulting from chronic exposure to air jet acting on antigen-presenting immune cells, may influence the differentiation of bipotential helper T-cells away from a Th1 phenotype towards a Th2 phenotype.

These results of suppression of cellular immunity and in potentiating of humoral immunity. Thyroid autoimmunity is clinically expressed as Hashimoto's thyroiditis or as Graves' disease [63,64]. The different phenotypic expressions of thyroid autoimmunity are largely dependent on the balance of Th1 versus Th2 immune response. Predominance of Th2-mediated immune response may induce antigen specific B lymphocytes to produce anti-TSH receptor (TSHr)

antibodies causing Graves' disease [65,66].

Finally, this work has demonstrated the impact of chronic hypertension induced by air jet stress on the likelihood of developing hyperthyroid problems expressed by increasing levels of TSH, T3 and T4 plasma in the hypertensive rat.

REFERENCE

- Zoeller, R.T., Tan, S.W., Tyl, R.W. (2007), General background on the hypothalamic–pituitary–thyroid (HPT) axis. *Crit. Rev. Toxicol.* 37, 11–53. |
- Williams, G.H and Braunwald, R. (1980), Endocrine and nutritional disorders and heart disease. Braunwald E (ed). *Heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. Philadelphia: W.B.Saunders, 825-53. | | 3. Woeber, K.A. (1992), Thyrotoxicosis and the heart. *N Engl J Med*, 327, 94-8. | | 4. Philipson, K.D., and Edelman, I.S. (1977), Thyroid hormone control of Na⁺-K⁺-ATPase and K⁺-dependent phosphatase in rat heart. *Am J Physiol*, 232, 96-201. | | 5. Johnson, P.N., Freedberg, A.S., Marshall, J.M. (1973), Action of thyroid hormone on the transmembrane potentials from sinoatrial node cells and atrial muscle cells in isolated atria of rabbits. *Cardiology*, 58, 273-89. | | 6. Resnick, L.M., and Laragh, J.H. (1982), Plasma renin activity in syndromes of thyroid hormone excess and deficiency. *Life Sci*, 30, 585-586. | | 7. Sawin, C.T., Geller, A., Wolf, P.A., et al. (1994), lowserum thyrotropin concentrations as risk factor for atrial fibrillation in older persons. *N Engl J Med*, 331, 1249-1252. | | 8. Marvisi, M., Brianti, M., Marani, G., et al. (2002), Hyperthyroidism and pulmonary hypertension. *Respir Med*, 96, 215-220. | | 9. Klein, I., and Ojamaa, K. (2001), Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*, 344, 501-509. | | 10. Wocher, K.A. (1992), Thyrotoxicosis and the heart. *N Engl J Med*, 327, 94-98. | | 11. Turakulov, I.A., and Burikhanov, R.B. (1993), Role of norepinephrine in the regulation of thyroid gland functional activity in rabbits. *Probl Endokrinol (Mosk)*, 39 (4), 45-8. | | 12. Aguilera, G., Kiss, A., Sunar-Akbasak B. (1995), Hyperreninemic hypoadosteronism after chronic stress in the rat. *J Clin Invest*, 96 (3), 1512-9. | | 13. Andrey, V. (2010), Endoplasmic reticulum stress in proteinuric kidney disease –Department of Medicine McGill University Health centre. Montreal Quebec, Canada, 77, 187-193. | | 14. Kidd, P. M. (2007), Glutathione: systemic protectant against oxidative and free radical damage. *Altern. Med Rev*, 2, 155 – 176. | | 15. Mari, G., Morganti, B., Merlo, C. (2009), Administration of sulpiride or domperidone for advancing the first ovulation in deep an estrous mares. *J. Nestrous Mares Theriogenology*, 71, 959-965. | | 16. Blotta, M. H., Dekruyff, R.H., Umetsu, D.T., (2007), Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in DC4+ lymphocytes. *J. Immunol.* 158, 5589 – 5595. | | 17. McEwen, B.S., (2000), Allostasis and allostatic load: implications for neuro psychopharmacology. *Neuropsychopharmacology*, 22, 108-124. | | 18. Cremaschi, G.A., Gorelik, G., Klecha, A.J., Lysionek, A.E., Genaro, A.M., (2000), Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis. *Life Sci*, 67, 3171-3179. | | 19. Silberman, D.M., Wald, M., Genaro, A.M., (2002), Effects of chronic mild stress on lymphocyte proliferative response: participation of serum thyroid hormones and corticosterone. *Int. Immunopharmacol.* 2, 487- 497. | | 20. Snedecor, G.W., Cochran, W.G., (1980), *Statistical Method*. United State University Press, Iowa, London , 59-60. | | 21. Engel, G., and Schmale, A. (1972), Conservation-withdrawal: a primary regulatory process for organismic homeostasis. *CIBA Found. Symp*, 8, 57-75. | | 22. McEwen, B., Wingfield, J., 2003. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm. Behav.* 43, 2–15. | | 23. Davis, J.D., Tremont, G., 2007. Neuropsychiatric aspects of hypothyroidism and treatment reversibility. *Minerva Endocrinol* 32, 49–65. | | 24. Lundin, S., Ricksten, S.E., Thorén, P., (1984), Interaction between "mental stress" and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*, 120, 273-281. | | 25. Lundin, S., Ricksten, S.E., Thorén, P. (1983), Interaction between mental stress and baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *J Hypertens-Suppl*, 1, 68-70. | | 26. Lundin, S., and Thorén, P. (1982), Renal function and sympathetic activity during mental stress in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*, 115, 115-124. | | 27. Koepke, J.P., DiBona, G.F., (1985), Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during hypertension. (*3 Pt 1*), 350-6. | | 28. Julien, C., Cerutti, C., Kandza, P., Barres, C., Su D., Vincent, M., Sassard, J., (1988), Cardiovascular response to emotional stress and spontaneous blood pressure variability in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 15, 533-538. | | 29. Kalsbeek, A., Fliers, E., Franke, A., Wortel, J., Buijs, R. (2000), Functional connections between the supra-chiasmatic nucleus and the thyroid gland as revealed by lesioning and viral tracing techniques in the rat. *Endocrinology*, 141, 3832–3841. | | 30. Langer, P., Foldes, O., Kvetnansky, R., Culman, J., Torda, T., El Daher, F., (1983a), Pituitary-thyroid function during acute immobilization stress in rats. *Exp. Clin. Endocrinol*, 82, 51-60. | | 31. Langer, P., Vigas, M., Kvetnansky, R., Foldes, O., Culman, J. (1983b), Immediate increase of thyroid hormone release during acute stress in rats: effect of biogenic amines rather than that of TSH? *Acta Endocrinol*, 104 (4), 443-449. | | 32. Osko, J. 1996. Liberation of thyrotropin, thyroxine and triiodothyronine in the controllable and uncontrollable stress and after administration of naloxone in rats. *J. Physiol. Pharmacol.* 47 (2), 303-310. | | 33. Kioukia-Fougia, N., Christofidis, I., Strantzalis, N. (1999), Physicochemical conditions affecting the formation/stability of serum complexes and the determination of prostate-specific antigen (PSA). *Anticancer Res*, 19 (4B), 3315-3320. | | 34. Kirkegaard, C., Faber, J., (1998), The role of thyroid hormones in depression. *Eur. J. Endocrinol*, 138, 1-9. | | 35. Hoftari, H., Pakarinen, A., Kauppila, A. (1987), Serum concentrations of thyrotropin, thyroxine, triiodothyronine and thyroxine binding globulin in female endurance runners and joggers. *Acta Endocrinol*, 114, 41-46. | | 36. Opstad, P.K. (1994), Circadian rhythm of hormones is extinguished during prolonged physical stress, sleep and energy deficiency in young men. *Eur. J. Endocrinol*, 131, 56-66. | | 37. Baumgartner, A., Graf, K.J., Kurten, I., Meinhold, H. (1988), The hypothalamic-pituitary-thyroid axis in psychiatric patients and healthy subjects: parts I & 4. Part 4: TRH tests, thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodo- thyronine determinations in medical students during a major examination. *Psychiatry Res*, 24, 316-332. | | 38. Turakulov, Y., Burikhanov, R., Pakitdinov, P., Myslitskaya, A. (1994), Influence of immobilization stress on the levels of thyroid hormones. *Neurosci. Behav. Physiol*, 24, 462-464. | | 39. Cizza, G., Brady, L., Escpales, M., Blackman, M., Gold, P., Chrousos, G. (1996), Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic-pituitary-thyroidal function in Fisher 344/N rats. *Neuroendocrinology*, 64, 440–448. | | 40. Pollard, J., Basset, J.R., Cairncross, K.D. (1979), Plasma thyroid hormone and glucocorticoid concentrations in the male rat following prolonged exposure to stress. *Aust. J. Biol. Sci.* 32, 237-242. | | 41. Servatius, R., Natelson, B., Moldow, R., Pogach, L., Brennan, F., Ottenweller, J. (2000), Persistent neuroendocrine changes in multiple hormonal axes after a single or repeated stressor exposures. *Stress*, 3, 263–274. | | 42. Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapi, C., Christofidis, I., Papadopoulou-Daifoti, Z. (2002), The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. *Prog. Neuro-psychopharmacol. Biol. Psychiatry*, 26 (5), 823-830. | | 43. Kioukia, N., Bekris, S., Antoniou, K., Papadopoulou-Daifoti, Z., Christofidis, I. (2000), Effects of chronic mild stress (CMS) on thyroid hormone function in two rat strains. *Psychoneuroendocrinology*, 25 (3), 247-257. | | 44. Kondo, K., Harzub, M., Levy, A., Lightman, S. (1997), Inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in response to lipopolysaccharide is independent of changes in circulating corticosteroids. *Neuroimmunomodulation*, 4, 188-194. | | 45. Servatius, R., Natelson, B., Moldow, R., Pogach, L., Brennan, F., Ottenweller, J. (2000), Persistent neuroendocrine changes in multiple hormonal axes after a single or repeated stressor exposures. *Stress*, 3, 263-274. | | 46. Werner, S.C., Manger, W.M., Radichevich, I., Wolff, M. and Von Estorff, I. Excessive thyrotropin concentrations in the circulation of the spontaneously hypertensive rat (38679) (1975). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 148, 1013-1017. | | 47. Sowers, J.R., Tempel, G., Resch, G. and Colantino, M. (1978), Pituitary response to TRH and LHRH in spontaneously hypertensive rats (40356). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159, 397-399. | | 48. Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I.M.D. and Lechan, R.M. (1987), Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*, 238, 78-80. | | 49. Dyess, E. M., Sergerson, T. P., Liposits, Z., Paull, W. K., Kaplan, M. M., Wu, P., Jackson, I. M. D. (1988), and Lechan, R.M., Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 123, 2291-2297. | | 50. Szabo, M., Kovathana, N., Gordon, K., and Frohman, L.A. (1978), Effect of passive immunization with an antiserum to thyrotropin (TSH)-releasing hormone on plasma TSH levels in thyroidectomized rats. *Endocrinology*, 102, 799-805. | | 51. Taylor, T., Wondisford, F.E., Blaine, T. and Weintraub, B.D. (1990), The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology*, 126, 317-324. | | 52. Ciriello, J., Kline, R.L., Zhang, T. X. and Caverson, M.M. (1984), Lesions of the paraventricular nucleus alter the development of spontaneous hypertension in the rat. *Brain Res.* 310, 355-359. | | 53. Sawchenko, P. E., and Swanson, L. W. (1982), The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain. Res. Rev.* 4, 275-325. | | 54. Swanson, L.W., and Sawchenko, P.E. (1980), Paraventricular neurons: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, 31, 410-417. | | 55. Henry, J. L., and Calaresu, F. R. (1972), Topography and numerical distribution of neurons of the thoraco-lumbar intermedialateral nucleus of the cat. *J. Comp. Neurol.* 144, 205-214. | | 56. Qualy, J.M. and Westfall, T.C. (1988), Release of norepinephrine from the paraventricular hypothalamic nucleus of hypertensive rats. *Am. J. Physiol*, 251, 993-1003. | | 57. Kojima, A., Kubota, T., Sato, A., Yamada, T., Yamori, Y. and Okamoto, K. (1975), Congenital abnormality of pituitary-thyroid axis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and stroke-prone rats (SPR) (39081). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150, 571-573. | | 58. Murata, Y.T., Shimamura, T., Tagami, et al. (2008), The skewing of Th1 induced by lentian is directed through the distinctive cytokine production by macrophages with elevated intracellular glutathione content. *Immunopharmacol*, 2, 673 -689. | | 59. Abbas, A.K., Murphy, W. B. K. M., Sher, A. (2009), Functional diversity of helper T-lymphocytes. *Nature*, 383, 787 - 795. | | 60. Webster, E.L., Torpy, D. J., Elenkov, I.J., and Chrousos, G. P. (2009), Corticotropin-releasing hormone and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 21 - 23. | | 61. Panzani, D.I., Zicchino, A., Taras, P. (2011), Sulpiride use of dopamine antagonist sulpiride to advance first ovulation in transitional mares. *Theriogenology*, 75, 138-143. | | 62. Rook, G. A. W. (2010), Glucocorticoids and immune function. *Bail. Clin. Endocrinol. Metab.* 13: 567 – 581. | | 63. Schwartz, K.E. (2002), Autoimmunity, dehydroepiandrosterone (DHEA), and stress. *J. Adolesc. Health*, 305, 37 - 43. | | 64. Roura – Mir, C. M., Catalf, M., et al. (2010), Single-cell analysis of intrathyroidal lymphocytes shows differential cytokine expression in Hashimoto's and Graves' disease. *Eur. J. Immunol*, 27, 3290 – 3302. | | 65. Trinchieri, G. (2008), Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol*, 13, 251 – 276. | | 66. Awerman, L. M. (2010), Chronic Psychological stress alters body weight and blood chemistry in European starlings. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 156, 136-142. |

The Contribution of Administration Techniques Related to Pseudo-Stress in the Preventive Effectiveness of Hesperidin Against Neurobehavioral and Immunological Disorders Induced by an Air Jet Stress in Wistar Rats

Nessaibia Issam^{*1}, Chouba Ibtissem¹, Benatoui Rima¹, Faci Hayette¹, Boukhris Nadia^{1,2}, Tahraoui Abdelkrim¹

¹Laboratoire de Neuro-endocrinologie Appliquée, Département de Biologie, Université Badji Mokhtar, BP 12, 23000, Annaba, Algeria

²Service de Médecine Interne, Centre Hospitalier Universitaire Ibn Sina, 23000, Annaba, Algeria

Available Online: 4th June, 2015

ABSTRACT

Aggressors from outside the body appear to alter its equilibrium, usually associated with an adaptive response against an aggressor that remains unknown to the nervous system as it works as a sufficiently intensified stimulus, capable of activating pain centers and evoking memorial trauma. This study was conducted on male Wistar rats, a model of choice for the study of anxiety has shown the importance of non-invasive administration techniques for the treatment by hesperidin, including the oral administration technique. Compared with this administration technique, a month of hesperidin injections (40 mg/kg) did not show enough preventive ability against significant immune and behavioral alterations induced by 2 h of air jet in the cage of the animal identified by the leukocyte formula and elevated T-maze test. This study suggests that unlike oral administration, the handling and pain associated with repeated intra-peritoneal injections cause the generation of a pseudo-stress expressed by a significant increase of the obtained plasma levels of the adrenocorticotropin hormone (ACTH). These immune-endocrine mediations triggered after such a negative contact with the animal (injections) may have side effects on the efficiency of hesperidin by slowing the anxiolytic properties in addition to the less obvious impact of white cells due to the immune resistance to glucocorticoids.

Key words: Administration techniques; hesperidin; anxiety-like behavior; immunological disorders; ACTH; air jet stress

INTRODUCTION

Aggressors from outside the body appear to alter its equilibrium, usually associated with an adaptive response against an aggressor that remains unknown to the nervous system as it works as a sufficiently intensified stimulus, capable of activating pain centers and evoking memorial trauma^{1,2}. These stressors can be a result of environmental perturbations or social interactions. Regardless of the type of stressor, prolonged exposure to stress can have profound, long-lasting effects on physiology and behavior³. These changes are mediated by specific neuroendocrine mechanisms, including the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. Increased HPA activity in response to stress, and the resultant release of adrenal glucocorticoids, can exert substantial effects on physiology, including brain remodeling and immune modulation³.

Such stimuli may be similar to the treatment of laboratory animals, for instance with natural antioxidants such as hesperidin. Although whether taken orally or by an intra-peritoneal injection, hesperidin represents an important way to reduce metabolic disorders and the abundance of

free radicals caused by the action mode of stress hormones and cytokines on the oxidation of target cells⁴⁻⁶. Therefore, the handling and infection processes are likely to compromise the quality of the results obtained by blood numbering and behavioral tests aimed at demonstrating the effectiveness of hesperidin using any experimental protocol due to the negligence of choosing an administration technique that minimizes the anxiety state of the animal that is the subject of this study.

We studied this effect by using two different administration techniques (intra-peritoneal injection and oral administration) with the same hesperidin dose to treat leukocyte and behavioral alterations caused by psychogenic stress (the air jet stress) in Wistar.

MATERIALS AND METHODS

Animals and housing

Thirty-two Wistar rats with initial weights between 230-250 g were purchased from the Pasteur Institute (Algiers, Algeria) to carry out this protocol where they were housed in translucent cages and acclimated to the conditions including a constant temperature of (25 ± 1 °C) with a

**Author for Correspondence*

Table 1. Details of materials used

Name	Hesperidin
Source	Sigma, St. Louis, MO, USA
Synonym	Hesperetin 7-rhamnoglucoside, Hesperitin-7-rutinoside
Empirical Formula	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅
Molecular Weight	610.56
Biochem/physiol Actions	Flavonoid phytochemical extracted from citrus species. It is the rhamnoglucoside (rutinoside) of hesperetin

Table 2. Plasma levels of ACTH in rats treated with the hesperidin (40mg/kg) by oral and intra-peritoneal routes.

Groups	ACTH (pg/ml)
T	1,93±0,107 ^C
S	3,51±0,301
IH	2,92±0,06 ^b
GH	2,46±0,354 ^{C:α}

light/dark cycle of 12 h/12 h (lights on at 7:30 am). The rats had access to standard food and drinking water presented in ad libitum bottles. The study protocol was carried out according to the NIH revised Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (no. 80–23, 1996).

The treatment and experimental groups

Thirty-two rats were divided into four groups (n = 8). The T group is the intact group. The GH group underwent a week of training receiving 2 ml of 5% sugar solution directly from the syringe. The animals adapted quickly to this procedure, which allowed the transition to oral administration of hesperidin (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 40 mg/kg. The same dose is given to the IH group, but via intra-peritoneal injection (i.p.). The antioxidant treatment duration took one month before the application of the air jet stress, which occurred simultaneously in the S group. Recent advances in the field of psychological trauma suggest exploring methods to prevent the onset of anxiety disorders up to 30 days before their apparitions take place⁷.

Air jet stress was chosen due to its recommendation by numerous scientific studies⁸⁻¹⁴, and it is an emotional stressor consisting of creating a 2-h constant air pressure of 1 bar using a compressor equipped with a gauge in the rat cage through a side port. After the air jet stress session, the behavior of the four groups of animals was tested in elevated T-maze tests. The rats were then sacrificed by decapitation under mild anesthetic diethyl ether and the blood collection was carried out in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes to determine the total white blood cell count. The serum prepared immediately by centrifugation at 3,000×g for 15 min. The supernatant is used for the measurement of the adrenocorticotropin hormone (ACTH).

The elevated T-maze

This test is applied to determine the anxiety disorders in rodents according to their escape behavior¹⁵. The device is prepared as a result of the obstruction of one closed arm of the elevated plus-maze test with a heavy cardboard barrier

(12 cm × 40 cm)¹⁶. Every rat was placed in the distal end of one of the two open arms and the time (latency) it takes to escape to the closed arms was measured in three consecutive sessions (escape 1, escape 2 and escape 3) at 30 second intervals. A maximum of 300 seconds was devoted for all sessions, indicating the end of the session if the animal does not display escape behavior. After each session, the rat was returned to its cage and the device was wiped with 70% ethanol.

White blood cell analysis

Total white blood cell count (WBC) was measured using a fully automated blood cell counter (PCE-210 model 2009, Japan).

ACTH

To measure the plasma levels of the ACTH hormone, ELISA tests were performed as directed by the manufacturers. The kit for ACTH assay was obtained from Phoenix Pharmaceuticals Inc. Burlingame, USA.

Statistical analysis

All data are expressed as the mean ± SEM (standard error of the mean). All groups showed normal distributions, so a parametric statistical method; the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the post-hoc Dunnett's test when necessary, was used for multiple comparisons. The value of p<0.05 was considered as significantly different. Data were analyzed using MINITAB (Minitab® 15.1.1.0., Minitab Inc., USA).

RESULTS

Anxious behavior in the elevated T-maze test

Rats exposed to air jet stress have shown a significantly low escape latency compared with the T group rats (p <0.001), but no significant difference was noted during the three escape sessions between the S and IH groups. This is not the case with rats administered hesperidin orally for escape attempts 1, 2 and 3 (p <0.001). These results explain the difference in the GH group compared with the IH group during the three sessions of the test (p <0.01) for escape attempt 1 and (p <0.001) for escape attempts 2 and 3 (Fig. 1).

White blood cell count

The results of WBC formula show a highly significant decrease in rats exposed to air jet stress (p <0.001, Fig. 2) compared with the intact group T. between the GH and IH groups, there is a significant difference (p <0.05).

Plasma level of ACTH

The results are expressed as the mean ± SEM. ^a P < 0.05, ^b P < 0.01 and ^c P < 0.001 vs. S; ^α P < 0.05 IH vs. GH.

The results after two hours of air jet stress show a significant increase in the plasma levels of ACTH compared with groups T, GH (p <0.001) and IH (p <0.01). However there is significant difference between the GH group and IH group (p <0.05).

DISCUSSION

Hesperidin (HN, hesperetin-7-rutinoside) is a flavanone glycoside abundant in the fruits of the citrus family such as oranges and lemons¹⁷. Experimental applications of this substance on animals and humans have many beneficial effects including antioxidant and anti-inflammatory

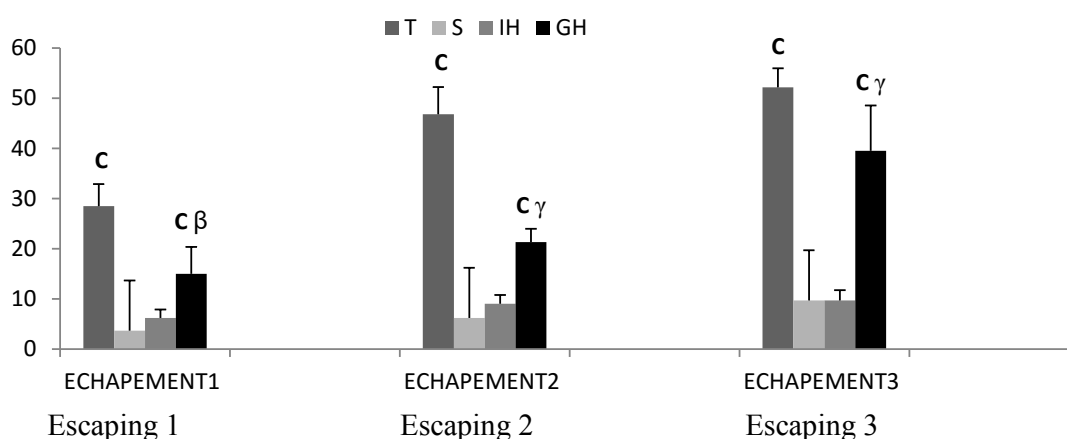


Figure 1: The parameters in the elevated T-maze test among rats pretreated with hesperidin by oral and intra-peritoneal routes and exposed for 2 h to air jet stress. The results are expressed as the mean \pm SEM. ^c $P < 0.001$ vs. S; ^β $P < 0.01$ and ^γ $P < 0.001$ IH vs. GH.

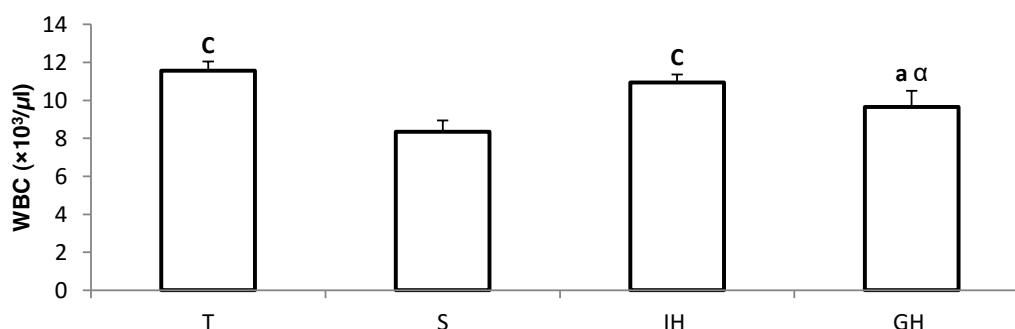


Figure 2: The white blood immune cell count of rats pretreated with hesperidin by oral and intra-peritoneal routes and exposed for 2 h to air jet stress. The results are expressed as the mean \pm SEM. ^a $P < 0.05$ and ^c $P < 0.001$ vs. S; ^α $P < 0.05$ IH vs. GH.

effects, in addition to a remarkable ameliorative capacity of the central nervous activity and the hematological system¹⁸⁻¹⁹. Very soluble in water, hesperidin could be administered orally and intra-peritoneally (i.p.). In many recent studies, such as the research of Wasowski, who demonstrated that acute and chronic i.p. administration depress the locomotor and exploratory activities within mice, unlike oral route that remain intact and induce an anxiolytic effect⁴.

The same finding was obtained in this study after one month of hesperidin pretreatment in Wistar rats with an average of dose of 40 mg/kg. Compared with the oral administration, the injected group had less protection against behavioral alterations in response to the air jet stress as reflected in the three sessions of the elevated T-maze test, we found an escaping behavior in rats injected with hesperidin similar to that of the stressed group, with a learning latency between sessions, which revealed a slight improvement in the time spent in the open arm from one session to the next. Stress caused by negative interactions with the experimenter, will damage the learning and cognition abilities of the rat; thereby undermining the usefulness of the animals in biomedical research and limiting the external validity of the conclusions drawn from the data²⁰⁻²². In contrast, positive contact between

animals and humans, such as the administration of hesperidin directly from the syringe after habituation training of the procedure for one week with a 5% sweet solution, can reduce the stress response associated with experimental practices. This was previously reported in the results of the elevated T-maze tests, which indicates that this group responds better to the antioxidant. These observations suggest that animal interactions with humans during the oral administration of a natural antioxidant imitate the positive social interactions of the species (e.g. tickling, substituting the tactile stimulation, caressing and substituting the tactile stimuli received during social grooming) could be used as alternative rewards that replace the aversive effects of the injections²³⁻²⁴.

Behavioral changes elucidated after the rats were exposed to the air jet stress showed a particular immune distribution; white blood cell levels were depressed in associated with a significant increase in ACTH level. In fact, scientific studies have shown that the exposure of rodents to important social challenges, in this case to a 2-h episode of jet air causes the high level of oxidative damage that can probably disrupt the balance between proliferation and blood cell apoptosis²⁵⁻³¹. The exact mechanism is not clear; however, researchers suspect the mediation of glucocorticoid-related stress. Pretreatment with hesperidin

could partly prevent these immune alterations triggered by sending a jet of air in to the cages of treated rats, as hesperidin has important antioxidant properties and acts through several physiological systems^{1, 6, 32-35} and directly affects the stress axis (HPA). According to Cai et al, hesperidin inhibits the expression of the mRNA of corticotrophin-releasing factor (CRF) in the hypothalamus and regulates the increase of ACTH hormone and the GR glucocorticoid receptor protein³⁶.

The main issue our results raise is why, unlike the outcomes of the behavioral tests, did the injected hesperidin seem to better restore the values of white cells from damage from the oral air jet stress?

Some studies suggest there is a specific window in which the development of specific response may be altered by stress. During a primary response, exposure to stress just before or during the 24 h following vaccination would be a critical period. Stress occurring later would have little or no effect³⁷⁻⁴⁰. From this perspective, we argue that the handling coupled to the injection procedure repeated for one month is a pseudo-chronic stressor that prevents an immune deviation when exposed to the air jet stress such as the one observed in the group administered hesperidin orally and wherein the lack of aversive contact with the rats makes them immunologically naive to the stressful session of the air jet following treatment. Neglecting such an immune-resistance process by researchers will likely decrease the quality of collected immunity data by overestimating the immune-pharmacological effectiveness of any natural product, including hesperidin, due to non-consideration of the anxiety impact of the treatment technique on the psychological status of the experimental model. Despite this, the negative effects of pain, stress and distress and their influence on study outcome are either not reported or underreported in published scientific papers⁴¹. What is clear, however, are that handling effects can significantly alter an animal's immune status—either enhancing or compromising—and could have important methodological implications³⁸.

We have finally demonstrated that hesperidin, administered either by intra-peritoneal injection or oral administration, maintains a preventive efficiency against neurobehavioral and immunological changes that may be induced during psychological stress, as is the case of air jet stress. However, this work supports the consideration of non-invasive techniques such as oral administration that provides the animal with a positive contact link with the experimenter and avoids the physical aggressiveness of handling and the pain of repeated narcosis. As we demonstrated will compromise the data of behavioral tests during treatment with hesperidin by triggering a corticotropin response of ACTH level. In addition to air jet stress, it amplifies the animal's anxiety and thus delays its beneficial anxiolytic effect and also impacts the immune system. These disturbances may compromise the clarity of the behavioral and immunological results of research focused on the benefits of natural antioxidants including hesperidin. Consequently, we support, in an experimental protocol, the distinction between the control group receiving the vehicle (placebo) and the intact group to

isolate the effect of the drug on the active group compared with the administration effect itself.

REFERENCES

- Herbert T, Cohen S, Stress and immunity: a meta-analytic review. *Psychosom Med*1993; 55: 364-79.
- Besedovsky H, Del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrinol* 1996; 17: 64-102.
- Stefanski V and Engler H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *Journal of Neuroimmunology* 1999; 94: 144-152.
- Cristina W, Leonardo M, Loscalzo, Higgs J and Marder M. Chronic Intraperitoneal and Oral Treatments with Hesperidin Induce Central Nervous System Effects in Mice. *phytotherapy research phytother* 2012; 26: 308–312.
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S. Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression. *Anticancer* 2005; 25:3367–74.
- Garg, A, Garg, S, Zaneveld, L. J, and Singla, A. K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother* 2001; 15(8): 655–69.
- Rao TS, Asha MR, Ramesh BN. Understanding nutrition,depression and mental illnesses. *Indin J Psychiatry* 2008; 50 (2):77-82.
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between "mental stress" and baroreceptor reflexes concerning effects on heart rate, mean arterial pressure and renal sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand*1984; 120: 273-281.
- Lundin S, Ricksten SE, Thorén P. Interaction between mental stress and baroreceptor control of heart rate and sympathetic activity in conscious spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive (WKY) rats. *J Hypertens Suppl* 1983; 1: 68-70.
- Lundin S, Thorén P. Renal function and sympathetic activity during mental stress in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Acta Physiol Scand* 1982; 115: 115-124.
- Koepke JP, DiBona GF. Central beta-adrenergic receptors mediate renal nerve activity during
- Julien C, Cerutti C, Kandza P, Barres C, Su D, Vincent M, Sassard J. Cardiovascular response to emotional stress and spontaneous blood pressure variability in genetically hypertensive rats of the Lyon strain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15: 533-538.
- DiBona GF, Jones SY. Analysis of renal sympathetic nerve responses to stress. *Hypertension* 1995; 25: 531-538.
- Zhang ZQ, Julien C, Barrès C. Baroreceptor modulation of regional haemodynamic responses to acute stress in rat. *J Auton Nerv* 1996; 60: 23-30.
- Gobira PH, Aguiar DC, Moreira FA. Effects of compounds that interfere with the endocannabinoid system on behaviors predictive of anxiolytic and panicolytic activities in the T maze. *Pharmacol. Biochem Behav* 2013; 110: 33-9.

16. Estanislau C, Morito S. Prenatal stress produces more behavioral alterations than maternal separation in the elevated plus-maze and in the elevated T-maze. *Behav Brain Res* 2005; 163:70–7
17. Ross JA, Kasum CM. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002; 22:19–34.
18. Nielsen IL, Chee WS, Poulsen L, et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of the citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Nutr* 2006; 136: 404–408.
19. Yamamoto M, Suzuki A, Hase T. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2008; 54:95–98.
20. Wolfle T. Laboratory animal technicians. Their role in stress reduction and human-companion animal bonding. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 1985; 15: 449–454.
21. Sherwin C.M, Olsson I.A.S. Housing conditions affect self-administration of anxiolytic by laboratory mice. *Anim. Welfare* 2004; 13: 33–38.
22. Pekow C. Defining, measuring, and interpreting stress in laboratory animals. *Contemp. Top. Lab. Anim.* 2005; 44: 41–45.
23. Panksepp J, Burgdorf J. Laughing rats and the evolutionary antecedents of human joy? *Physiol. Behav* 2003; 79: 533–547.
24. Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol. Behav* 2001; 72: 167–173.
25. Irie M, Asami S, Ikeda M, Kasai H. Depressive state relates to female oxidative DNA damage via neutrophil activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 311: 1014-1018.
26. Epel E.S, Blackburn E.H, Lin J, Dhabhar F.S, Adler N.E, Morrow J.D, Cawthon R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *PNAS* 2004; 101: 17312-17315.
27. Forlenza M.J, Miller G.E. Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression. *Psychosom. Med* 2006; 68: 1-7.
28. Gidron Y, Russ K, Tissarchondou H, Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical re-view. *Biol. Psychol* 2006; 72: 291-304.
29. Voehringer DW. BCL-2 and glutathione: alterations in cellular redox state that regulate apoptosis sensitivity. *Free Rad Biol Med* 1999; 27:945-50.
30. Irani K. Oxidant signalling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signalling. *Circ Res* 2000; 87:179-83.
31. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Rad Biol Med* 2000; 28:1387-404.
32. Deng W, Fang X, Wu J. Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron? *Radiat Phys Chem* 1997; 50(3): 271-6.
33. Suarez J, Herrera MD, Marhuenda E. In vitro scavenger and antioxidant properties of hesperidin and neohesperidin dihydrochalcone. *Phytomedicine* 1998; 5(6): 469-473.
34. Jovanovic SV, Steenken S, Tosic M, Marjanovic B, Simic MG. Flavonoids as anti-oxidants. *J Am Chem Soc* 1994; 116(11): 4846-51.
35. Nandakumar N, Balasubramanian MP. Hesperidin a citrus bio-flavonoid modulates hepatic biotransformation enzymes and enhances intrinsic antioxidants in experimental breast cancer rats challenged with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *J Exp Ther Oncol* 2012; 9(4): 321-35.
36. Cai L, Li R, Wu QQ, Wu TN. Effect of hesperidin on behavior and HPA axis of rat model of chronic stress-induced depression. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2013; 38 (2): 229-33.
37. Kusnecov A. W and Rabin B. S. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *Journal of Neuroimmunology* 1993; 44: 33-42.
38. Moynihan J. A, Ader R, Grota L. J, Schachtman T. R Cohen N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain, Behavior, and Immunity* 1990; 4: 1-12.
39. Wood P. G, Karol M. H, Kusnecov A. W, Rabin B. S. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 1993; 7: 121-134.
40. Zalcman S, Minkiewicz-Janda A, Richter M, Anisman H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 1988; 2: 254-266.
41. Reinhardt V and Reinhardt A. Blood collection procedure of laboratory primates: a neglected variable in biomedical research. *J Appl Anim. Welfare Sci* 2000; 3:321-333.

**UNIVERSITE BADJI MOKHTAR ANNABA
FACULTE DE MEDECINE - DEPARTEMENT DE PHARMACIE**



LES DEUXIEMES JOURNEES DU DEPARTEMENT DE PHARMACIE

ANNABA LES 27 ET 29 MAI 2014

ATTHEMATATION

Nous soussignés, attestons que:

NESSAIBIA ISSAM, CHOUBA I., FACI H., TAHRAOUI A. K.

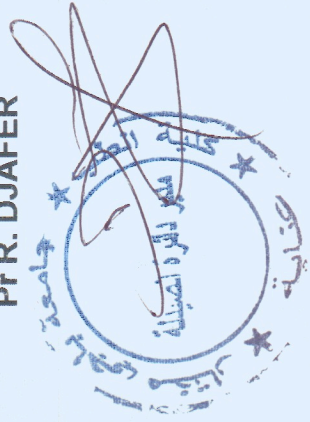
a participé aux deuxièmes journées du département de pharmacie en qualité de communicant sous le thème:

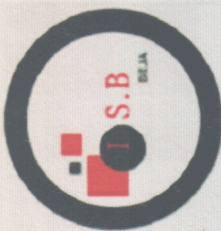
Utilisation du véhicule na cl 0.9% en temps qu'un placebo, impacte anxiogène sur les rats wistar et pharmacologique lors du traitement avec l'hespéridine (40mg/kg).

Type de communication : Affichée

Le Président de Séance

**Le Président des journées
Pr R. DJAFER**





جمعية تونس للتكنولوجيا والموارد البيولوجية

Association Tunisienne de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources



II^{ÈME} CONGRÈS INTERNATIONAL DE BIOTECHNOLOGIE ET VALORISATION DES BIO-RESSOURCES (BVBR)

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le Comité d'Organisation du 2^{ème} Congrès de Biotechnologie et Valorisation des Bio-Ressources tenu du
18 au 20 Mars 2014 à l'HOTEL MEHARI – Tabarka, atteste que :

Mr, *Mlle, M^{lle} Nessaïbia.. Issam* . a participé activement aux journées et a
présenté une communication . *par...offiche*

Le Comité d'Organisation

*Association Tunisienne
de Biotechnologie et Valorisation
des Bio - Ressources*

**SOCIÉTÉ DES SCIENCES
NATURELLES DE
TUNISIE (SSNT)**

- Siège Social :
Faculté des Sciences de Tunis
2092 - El Manar II Tunis - Tunisie
- C.C.B. (RIB) :
12103000450500022145
UIB Agence Essaâdi
- Identifiant : 832326229
- Tél. : 00 216 71 882 200
- Fax : 00 216 71 885 480
- E-mail : ssnt2006@gmail.com

ATTESTATION

NOM DE FAMILLE: NESSAIBIA

Prénom : ISSAM

Institution : Université Badj Mokhtar Annaba ALGERIE

A présenté une communication par affiche intitulée :

**L'ADMINISTRATION PASSIVE PAR GAVAGE AMELIORE
L'EFFICACITE DE L'HEPESIDINE (40mg/kg) CONTRE LES
TROUBLES DE L'HYPERTENSION AIGUE INDUITES PAR L'AIR
JET STRESS CHEZ LE RAT SOUCHE WISTAR**

**AUX XXIV^{èmes} JOURNEES
NATIONALES DE BIOLOGIE DE LA SSNT**

Cette attestation est délivrée à l'intéressé (e) pour servir et valoir ce que de droit.

Tunis le 23 Décembre 2014

Le Président de la SSNT

Pr. Sadok BOUZID



**الجمعية التونسية
للعلوم الطبيعية**

- المقر الاجتماعي :
كلية العلوم بتونس - 2092 المنار II تونس
- الهاتف : 00 216 71 882 200
- الفاكس : 00 216 71 885 480
- المعرف : 832326229



This study was carried out on male Wistar rats has shown the importance of the non-invasive administration techniques for the treatment by hesperidin, including oral administration technique. Compared to this administration technique, a month of hesperidin injections (45 mg / kg) does not show enough preventive ability against significant immune and behavioral alterations induced by two hours of air jet in the cage of the animal identified respectively by the leukocyte formula and behavioral tests: Open field, Elevated plus-maze, Elevated T-maze and Light/Dark Box.

This study suggests that unlike oral administration, the Handling and the pain associated with repeated intra-peritoneal injections cause the generation of a pseudo-stress expressed by a significant increase of the obtained plasma levels of ACTH, IL-6 and CRP shown using only injections of hesperidin vehicle NaCl 0.9% (1ml/kg). These immune-endocrine mediations triggered after such a negative contact with the animal (injections) may have side effects on the efficiency of hesperidin by slowing the anxiolytic properties.

Key words: Administration techniques, hesperidin, anxiety-like behavior, immunological disorders, IL6, ACTH



**LABORATOIRE DE
RECHERCHE
NEURO-
ENDOCRINOLOGIE
APPLIQUÉE**

**THESE
DE DOCTORAT**

**Filière
Biologie animale**

**Option
Neuro-immuno-
endocrinologie appliquée**



Nessaïbia Issam

E-mail : issamland @ yahoo.fr

Website:

issamland.wixsite.com

Scan
to discover !



Download this free Unitag App to scan
at unitag.io/app

