



HAL
open science

L'anxiété trait et son lien avec l'expression des sous-unités des récepteurs (GABAA, 5-HT1A, μ -opioïdes et α 1-adrénergiques) et des marqueurs du stress oxydatif au niveau du SNC (neurones et cellules gliales) et au niveau périphérique (immunité cellulaire et humorale) : évaluation des effets de substances naturelles à potentiel cytoprotecteur

Hassan Rammal

► **To cite this version:**

Hassan Rammal. L'anxiété trait et son lien avec l'expression des sous-unités des récepteurs (GABAA, 5-HT1A, μ -opioïdes et α 1-adrénergiques) et des marqueurs du stress oxydatif au niveau du SNC (neurones et cellules gliales) et au niveau périphérique (immunité cellulaire et humorale) : évaluation des effets de substances naturelles à potentiel cytoprotecteur. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2008. Français. NNT : 2008METZ018S . tel-01752585

HAL Id: tel-01752585

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752585>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Université Paul Verlaine-Metz

U.F.R de SciFA

École Doctorale Biologie, Santé, Environnement

Thèse de doctorat pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'Université Paul Verlaine-Metz
Mention : Pharmacologie-Phytochimie**

Par

Hassan Rammal

L'anxiété trait et son lien avec l'expression des sous-unités des récepteurs (GABA_A, 5-HT_{1A}, μ -opioïdes et α_1 -adrénergiques) et des marqueurs du stress oxydatif au niveau du SNC (neurones et cellules gliales) et au niveau périphérique (immunité cellulaire et humorale).

Evaluation des effets de substances naturelles à potentiel cytoprotecteur

Soutenue publiquement le 23 Octobre 2008

Jury

M. R. Soulimani	MCF, HDR, Université de Metz (France)	Directeur de thèse
M. E. Cooper	Professeur, Université de Californie (USA)	Rapporteur
Mme. A. Kiemer	Professeur, Université de Sarrebruck (Allemagne)	Rapporteur
M. C. Younos	Professeur, Université de Metz (France)	Examinateur
M. H. Schroeder	MCF, Université de Nancy (France)	Examinateur
M. J. Falla	Professeur, Université de Metz (France)	Examinateur
Mme. N. Boujedaini	Responsable scientifique, Laboratoires BOIRON (France)	Examinateur

Je dédie cette thèse

À **mes parents**, ces êtres qui me sont les plus chers au monde. Je vous remercie du plus profond de mon coeur pour m'avoir soutenu et encouragé durant toutes mes études universitaires.

À **Caterina**, je te remercie profondément, pour ton appui inconditionnel, ta compréhension, ton écoute et ta bonne humeur qui m'ont réconforté et permis de traverser les moments les plus difficiles.

À toute ma famille, mes amis et mes proches.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe Ethnobotanique et Pharmacologie/Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité de l'Université P. Verlaine de Metz, dirigée par **Rachid SOULIMANI, MCF HDR**, envers qui je tiens à exprimer ma profonde gratitude pour avoir accepté de diriger ces travaux, de la confiance qu'il m'a accordé en m'accueillant au sein de son équipe et de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail, notamment grâce à ses judicieux conseils et son encadrement, m'ayant aidé ainsi à faire mes premiers pas dans le monde de la recherche.

J'adresse mes plus sincères remerciements et reconnaissances au **Professeur Chafique YOUNOS**, pour tout le soutien, l'aide et les conseils pertinents qu'il a su m'apporter aux moments de mes besoins.

Je remercie également **Madame le Professeur Alexandra KIEMER** et sa collaboratrice **Mlle Elisabeth TYBL**, de m'avoir accueilli dans leur laboratoire pour la réalisation d'une partie de mon travail et d'avoir accepté d'apporter son concours pour examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au **Professeur Edwin COOPER** d'avoir accepté de juger ce travail et de se déplacer depuis les USA pour nous honorer de sa présence et de ses critiques constructives. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

J'adresse également mes forts remerciements au **Docteur Naoual BOUJEDAINI** d'avoir accepté de collaborer avec notre équipe sur ce sujet particulier et d'avoir également accepté d'en assumer le jugement scientifique.

J'exprime mes grands remerciements au **Professeur Jairo FALLA**, de m'avoir reçu dans son laboratoire, mais également pour ses conseils, sa rigueur scientifique, sa sympathie, ses encouragements et sa participation à mon jury de thèse.

J'exprime ma vive gratitude au **Docteur Henri SCHROEDER**, MCF à Nancy Université, pour ces judicieux conseils, et son acceptation de juger ce travail de thèse.

Je témoigne mes profonds remerciements au **Docteur Jaouad BOUAYED** pour sa gentillesse, son excellente assistance, ses conseils et pour les agréables moments que l'on a passés ensemble.

Je ne saurais oublier l'un des socles de notre équipe, **Frédéric DESOR** pour sa sympathie et pour son assistance technique très précieuse dans le cadre d'un travail de groupe.

J'adresse également mes remerciements au **Professeur Didier DESOR** de Nancy Université pour ses aides et ses conseils ponctuels relevant des aspects comportementaux et biostatistiques.

Je profite également de cette occasion pour remercier **Mrs Christian et Thierry** ainsi que **M Gilles CHAUFFERIN** des laboratoires **BOIRON** pour avoir pris en compte l'importance de ce sujet dans le domaine de la santé et d'avoir financé ce projet de recherche en fournissant

les moyens techniques (Médicaments) qui ont permis de valider les applications des différents modèles mis en place lors de cette étude.

Avant-propos

Une partie des résultats rapportés dans ce mémoire a donné lieu aux publications suivantes dans des revues scientifiques :

Article 1: Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Chafique Younos, Rachid Soulimani. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22(8), 2008, 1156-1159 (**IF=4.659**).

Article 2: Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Chafique Younos, Rachid Soulimani. The impact of high anxiety levels on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *European Journal of Pharmacology*, 589(1-3), 2008, 173-175 (**IF=2.35**).

Article 3: Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *European Journal of Pharmacology* 564 (2007) 146–149 (**IF=2.35**).

D'autres articles traitant de sujet de l'équipe universitaire et ne font pas partie de la thèse et qui ont constitué un travail de groupe :

Travaux dans des revues internationales à comité de lecture :

1) Article 4: Bouayed J, Piri K, Rammal H, Dicko A, Desor F, Younos C, Soulimani R. Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants. *Food Chemistry* 104 (2007) 364–368 (**IF=3.05**)

2) **Article 5:** Bouayed J, **Rammal H**, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. Journal of the Neurological Sciences. 262 (2007) 77–84 (**IF=2.412**).

3) **Article 6:** Bouayed J, Djilani A, **Rammal H**, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of *Catha edulis*. The Icfai Journal of Life Sciences 2(2), (2008), pp. 7-14.

Travaux dans des revues nationales à comité de lecture :

1) **Article 7:** **H. Rammal**, C. Younos, J. Bouayed, F. Desor, A. Chakou, T. Derouich, R. Soulimani. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Hippophae rhamnoides* L. Phytothérapie (2008) 6 : 115-116.

2) **Article 8:** **Rammal H.**, Younos C., Bouayed J, Chakou A., Bedouhene S., Soulimani R. Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Cichorium intybus* L. Phytothérapie (2008) 6 : 184-186.

3) **Article 9:** **Rammal H**, Younos C, Bouayed J, Desor F, Chakou A, Necerbey N, Soulimani R. Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Nasturtium officinale* R. Br. Phytothérapie (2008) 6 : 187-188.

4) **Article 10:** J. Bouayed, **H. Rammal**, C. Younos, A. Dicko, R. Soulimani. Caractérisation et bio-évaluation des polyphénols : nouveaux domaines d’application en santé et en nutrition. Phytothérapie (2008) 6 : 71-74.

5) Article 11: H. Rammal, J. Bouayed, F. Desor, C. Younos, R. Soulimani. Validation et contribution à l'étude de l'effet antihyperglycémique d'une plante médicinale, le *Momordica charantia* L. Phytothérapie. Article accepté pour publication (2009).

6) Article 12: Rammal H, Bouayed J, Desor F, Younos C, Soulimani R. Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Eryngium creticum* L. Phytothérapie. Article accepté pour publication (2009).

D'autres articles soumis ne sont pas présentés dans ce rapport :

Travaux soumis à des revues internationales à comité de lecture :

1) Article 13: H. Rammal, J. Bouayed, J. Falla, C. Younos, R. Soulimani. Immunoactive and antioxidant profile of *Desmodium adscendens* L. aqueous extract in mice.

2) Article 14: Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Frédéric Desor, Chafique Younos, Rachid Soulimani. Positive correlation between aggressive behaviour, anxiety level and oxidative status in mice.

3) Article 15: Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Jairo Falla, Chafique Younos, Naoual Boujedaini, Rachid Soulimani. The impact of the high anxiety level on cellular and humoral immunity in mice. NeuroImmunoModulation.

4) Article 16: Bouayed J, **Rammal H**, Dicko A, Younos C, Soulimani R. Antioxidant effect of plums and polyphenolic compounds against H₂O₂-induced oxidative stress in mice blood granulocytes. Journal of medicinal food.

Listes des principales abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA (Analysis of Variance) : Analyse de variance

ARN : Acide Ribonucléique

B : Lymphocyte B

BSA : Bovine Sérum Albumine

CCO : Chambre Claire/Obscure

CD : Cluster Déterminant

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellules Présentatrices de l'Antigène

DCF: 2',7'-dichlorofluoresceine

DCFH : Dichlorofluoresceine

DCFH-DA : 2',7'-diacetate dichlorofluoresceine

EDTA : Acide Ethylène-Diamine-Tétraacétique

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène

ESM : Erreur Standard à la Moyenne

GABA : Acide gamma-aminobutyrique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

5-HT : Sérotonine

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

IMF : Intensité Moyenne de Fluorescence

INF : Interféron

MCA : Médecine Complémentaire et Alternative

NK : cellules tueuses naturelles

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAMP : Motif Moléculaire Associé à un Pathogène (pathogen associated molecular pattern)

PBS (Phosphate Buffer Solution) : Tampon phosphate

RCB : Récepteur des Cellules B

RCT : Récepteur des Cellules T

RT-PCR : Réaction en Chaîne par Polymérase en Temps Réel

SNC : Système Nerveux Central

SRE : Système Réticulo-Endothélial

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TNF : Facteur Transformant de nécrose

Th : Lymphocyte T helper

TMB : 3,3', 5,5' Tetraméthylbenzidine

Tr : Lymphocyte T régulateur

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
PARTIE I : Recherche fondamentale	
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	
CHAPITRE I : RAPPEL SUR L'ANXIETE	6
I.1. Anxiété-état	7
I.2. Anxiété-trait	8
I.3. Anxiété pathologique	8
I.4. Les systèmes de neurotransmission régulateurs de l'anxiété	9
I.4.1. Le système GABAergique	9
I.4.2. Le système sérotoninergique	10
CHAPITRE II : RAPPEL SUR LE STRESS	13
II.1. Au niveau de l'organisme	13
II.2. Au niveau de la cellule	14
CHAPITRE III : RAPPEL SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE	17
III.1. Description générale	17
III.2. Reconnaissance immunitaire adaptative	18
III.3. Reconnaissance immunitaire innée	18
III.4. Les cellules du système immunitaire :	19
III.4.1. Les lymphocytes T et B	19
III.4.2. Granulocytes	21
III.4.3. Monocytes	21
III.4.4. Les cytokines : propriétés et activités	21
III.4.5. Les anticorps: propriétés, production et activités	22
OBJECTIFS DU TRAVAIL	23

MATERIELS ET METHODES	27
I. Animaux et conditions d'hébergement	27
II. Evaluation du niveau d'anxiété	27
II.1. Test de la chambre claire/obscur (CCO)	27
II.2. Procédure expérimentale	28
III. Stress expérimental	29
III.1. Principe	29
III.2. Procédure de l'application du stress par contention	30
IV. Evaluation immuntaire	31
IV.1. Cytométrie en flux	31
IV.1.1. Définition	31
IV.1.2. Principe	32
IV.1.3. Méthodologie	34
IV.1.3.1. Préparation du sang	34
IV.2. Technique E.L.I.S.A pour les dosages des immunoglobulines A, E et G	35
IV.2.1. Introduction	35
IV.2.2. Méthodologie	35
IV.2.2.1. Courbes d'étalonnages	36
IV.2.2.1.1. Procédure	36
IV.2.2.2. Dosage des IgA, IgE et IgG dans le sang périphérique	38
Procédure expérimentale	38
V. Quantification du statut oxydatif cellualire par l'évaluation du niveau des espèces réactives d'oxygènes à l'aide de la cytométrie en flux	38
V.1. Au niveau des leucocytes du sang périphérique	38
V.2. Au niveau des neurones et des cellules gliales	39

V.3. Principe	41
VI. Détermination de l'expression génique par RT-PCR	42
VI.1. Isolation de l'ARN, digestion de l'ADN et transcription inverse	42
VI.2. RT-PCR quantitative en temps réel SYBR green	43
VI.3. Analyses des données RT-PCR	44
VII. Analyses statistiques	44
RESULTATS	46
I. Choix du test comportemental et nature de l'anxiété	46
II. Etudes immunitaires	46
II.1. Effet du niveau de l'anxiété sur les cellules périphériques du sang (leucocytes) (immunité cellulaire)	46
II.2. Effets de l'anxiété sur l'immunité humorale par l'évaluation des immunoglobulines (A, E et G) dans le sang	47
II.3. Effets du stress expérimental par contention sur le niveau d'anxiété	48
II.3.1. Effets de l'anxiété couplée au stress aigu par contention sur l'immunité cellulaire (leucocytes)	48
II.3.2. Effets de l'anxiété couplée au stress subaigu par contention sur les leucocytes	49
II.4. Effets de l'anxiété couplée au stress aigu par contention sur les immunoglobulines (immunité humorale)	50
II.5. Effets de l'anxiété couplée au stress subaigu par contention sur les immunoglobulines	51
III. Evaluation de l'impact de l'anxiété sur le statut oxydatif des cellules périphériques (leucocytes)	52

IV. Evaluation de l'impact de l'anxiété sur le statut oxydatif des cellules centrales (neurones et cellules gliales) et périphériques (lymphocytes, granulocytes et monocytes)	53
V. Détermination de l'expression génique par RT-PCR	54
DISCUSSION ET CONCLUSION	57

PARTIE II : Recherche appliquée

Recherche des effets des médicaments homéopathiques sur les troubles comportementaux et immunitaires induits par l'anxiété

Evaluation des médicaments homéopathiques à profil anxiolytique ou immunotrope sur les animaux selon le niveau d'anxiété

1. Introduction	70
2. MATERIELS ET METHODES	72
2.1. Animaux	72
2.2. Évaluation des effets comportementaux	72
2.2.1. Administration des différents médicaments	72
2.3. Effets des médicaments homéopathiques sur l'immunité cellulaire et humorale	73
2.3.1. Cytométrie en flux pour l'immunité cellulaire	73
2.3.2. ELISA pour l'immunité humorale	73
2.3.3. Procédure expérimentale	73
2.4. Analyses statistiques	74
3. Résultats	74
3.1. Effet de <i>Gelsemium sempervirens</i> sur le comportement	74

3.1.1. Effet sur la latence de sortie	74
3.1.2. Effet sur le nombre de sorties	75
3.1.3. Effet sur le temps cumulé dans la chambre claire	76
3.2. Effet de médicaments homéopathiques sur l'immunité cellulaire et humorale	77
3.2.1. Effet du <i>Gelsemium sempervirens</i> sur l'immunité cellulaire	77
3.2.2. Effet du <i>Gelsemium sempervirens</i> sur l'immunité humorale	79
3.2.3. Effet du <i>Poumon Histamine</i> sur l'immunité cellulaire	81
3.2.4. Effet du <i>Poumon Histamine</i> sur l'immunité humorale	82
3.2.5. Effet du <i>Histaminum</i> sur l'immunité cellulaire	83
3.2.6. Effet du <i>Histaminum</i> sur l'immunité humorale	84
4. Discussion et conclusion	85
Références	89

INTRODUCTION

Introduction

L'anxiété est souvent employée comme un synonyme du mot « stress ». Il n'existe pas de définition universellement acceptée de celle-ci. Certains auteurs l'ont définie comme un état émotionnel complexe, une combinaison de sentiments de peur, d'appréhension et d'inquiétude, souvent accompagnés par une instabilité ou une tension (Graziani, 2005). L'anxiété, conséquence du stress environnemental et psychosocial, mais également une des causes supposées du stress oxydant, est considérée comme le mal du siècle par de nombreux chercheurs (Graziani, 2005; Kuloglu et al., 2002a,b) du fait de ses effets néfastes au niveau cellulaire et organique lorsqu'elle est chronique, intense, inéluctable et indésirable. La littérature décrit plusieurs types de troubles anxieux : troubles paniques, avec ou sans agoraphobie, agoraphobie sans antécédents de troubles paniques, phobies spécifiques (auparavant phobie simple), phobie sociale (trouble anxieté sociale), trouble obsessionnel compulsif, trouble d'anxiété généralisée, état de stress post-traumatique et état de stress aigu (Graziani, 2005). Des désordres d'origines diverses peuvent accompagner l'anxiété entraînant des troubles comportementaux et qui touchent, à titre d'exemple, environ 30 % des habitants des pays industrialisés (Gingrich, 2005) et semblent suivre une progression. Le lien de l'anxiété avec les désordres organiques et fonctionnels est de plus en plus discuté et les avis partagés entre la considération de l'anxiété comme conséquence ou cause font partie d'un débat très actif entre les membres de la communauté scientifique.

Le désordre induit par l'anxiété ou lié à l'anxiété semble avoir comme mécanisme d'affection le stress oxydant cellulaire. Ainsi, le stress oxydant est qualifié d'un état de déséquilibre cellulaire entre le système antioxydant et prooxydant endogène. Lors d'un excès de proxydation ou d'une faible activité antioxydante la balance est en faveur d'une production massive des espèces réactives oxygénées (ERO) (Halliwell and Gutteridge, 1999). Le rôle délétère des radicaux libres est de plus en plus connu et a été suggéré pour la première fois par

Harman en 1956 qui proposait que les ERO formées au cours de la respiration cellulaire provoquent des dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires cumulatifs, responsables du vieillissement et de la mort des êtres vivants (Harman, 1956). Parmi les voies *in vivo* qui produisent les intermédiaires réactives de l'oxygène la chaîne respiratoire mitochondriale constitue la source principale (Delattre et al., 2005). Lorsque leur production prédomine sur les systèmes de défense cellulaire endogène, des acides nucléiques, des protéines et des lipides, et d'autres composants cellulaires peuvent être la cible et subir des dommages (Cadenas, 1989) causant ainsi des troubles fonctionnels divers. L'implication du stress oxydant dans une multitude de maladies, en l'occurrence les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires, le cancer, le diabète et les problèmes psychiatriques, a été confirmée par plusieurs chercheurs (Ng et al., 2008; Valko et al., 2007; Haliwell, 2006a; Kuloglu et al., 2002a,b). Récemment, des études assez originales ont suggéré un lien entre le stress oxydant et l'anxiété au niveau central et périphérique et qui serait en faveur d'une anxiété conséquentielle à un niveau élevé du stress oxydant (Hovatta et al., 2005); d'autres auteurs ont plutôt suggéré que l'anxiété serait l'origine de la rupture de l'équilibre oxydatif induisant une production des ERO et des radicaux libres responsable des dégâts organiques et fonctionnels relevés (Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006; Kuloglu et al., 2002a,b; Bouayed et al., 2007b).

L'une des fonctions périphériques cibles du stress oxydant est le système immunitaire. Ce dernier participe au maintien de l'intégrité de l'organisme *via* un ensemble de mécanismes de défense visant à le protéger des intrus et des proliférations malignes. Cette fonction implique la capacité à identifier les intrus ou les cellules altérées, et à mettre en place rapidement des mécanismes de défense appropriés permettant leur éradication avant qu'ils n'aient eu le temps de nuire. De par cette fonction très importante, le système immunitaire repose sur plusieurs lignes de défense, allant des plus rudimentaires aux plus raffinées et

impliquant de nombreuses catégories cellulaires dont l'atteinte serait d'un grand impact fonctionnel (Pastoret et al., 1990).

De la même manière, l'une des autres cibles du stress oxydant est également le cerveau et ses diverses fonctions et qui est considéré comme étant extrêmement sensible au stress oxydatif en raison de sa grande consommation d'O₂, du glucose, et d'énergie et aussi de ses grandes quantités en acides gras peroxydable, ainsi que ses faibles taux en antioxydants (Floyd, 1997; Simonian and Coyle, 1996). Il est le siège d'une forte densité de neurones et de cellules gliales dont la fonction est de défendre et de préserver l'intégrité fonctionnelle. Une atteinte de ces cellules peut gravement nuire à la fonction de ces cellules et à la protection du cerveau (Sokoloff, 1991). Les neurones sont chargés de l'exécution de toutes les tâches liées à la sensibilité, la sensorialité, à l'analyse et à la neurotransmission sensitivo-motrice. Les cellules gliales constituent les cellules les plus abondantes dans le système nerveux central (SNC), et jouent un rôle critique dans la défense, le développement neuronal et dans la régulation de l'environnement chimique et ionique des neurones (Ransom, 2000). La neurodégénérescence, parmi d'autres pathologies importantes, peut survenir à la suite de plusieurs dysfonctionnements cellulaire ou neuromoléculaire et dont le stress oxydatif endogène représenté par une production massive excessive et permanente des ERO dans le SNC.

Dans le cadre de ce présent travail de recherche nous avons tenté de mettre en évidence certains liens et de valider certaines hypothèses relatives à la relation entre l'anxiété «trait», stable ou endogène, le stress oxydant et les atteintes cellulaires au niveau centrale et périphérique. Notre travail a comporté deux approches principales,

D'une part, une approche portant sur la validation scientifique des différentes hypothèses des liens supposés et, d'autre part et dans le cadre des applications de ces modèles,

d'évaluer les effets cytoprotecteurs des différentes substances médicamenteuses bioactives choisies pour ces études.

Au niveau de l'approche fondamentale, quatre volets ont été consacrés à la réalisation de ce travail de recherche, (1) l'évaluation de l'impact du niveau d'anxiété vis-à-vis des cellules périphériques sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, lymphocytes TCD4⁺, lymphocytes TCD8⁺ et cellules NK) et l'immunité humorale (immunoglobulines A, E et G) chez la souris, (2) l'étude de l'évolution de ces mêmes paramètres immunitaires sous l'influence d'une exposition au stress expérimental des souris selon leur niveaux d'anxiété, (3) l'évaluation de l'effet de l'anxiété sur le statut oxydatif des cellules périphériques (granulocytes, lymphocytes et monocytes) et des cellules centrales (neurones et cellules gliales) prélevées à différentes régions du cerveau et (4) l'évaluation du niveau de l'anxiété sur l'expression des gènes codants des récepteurs GABA_A, sérotoninergiques (5-HT_{1A}), μ -opioïdes et α_1 -adrénergiques dans les cerveaux des souris dont les autres paramètres ont été étudiés.

La deuxième approche de ce travail a plutôt porté sur un aspect appliqué consistant à évaluer les effets protecteurs et cytoprotecteurs des substances médicamenteuses (médicaments homéopathiques). Cette deuxième approche ouvre également la voie de la validation scientifique des effets de certaines substances naturelles et médicamenteuses à base des produits naturels. En effet, selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), les systèmes de santé de plusieurs pays du monde intègrent de plus en plus les utilisations des médecines à partir de substances naturelles et qui connaissent une croissance très importante même au sein des travaux publiés dans les revues scientifiques les plus importantes. Ce regain est lié à l'intérêt grandissant des médecines et des pratiques ancestrales aussi bien au niveau de la santé que l'alimentation et la nutrition. Ces approches thérapeutiques de plus en plus émergentes constituent une véritable alternative aussi bien dans le domaine de la médecine

conventionnelle que préventive et comportent un large éventail intégrant l'usage des nutriments, des plantes ou des extraits des plantes, des médicaments homéopathiques, des vitamines et des minéraux (Zollman et al., 1999). De toutes ces approches thérapeutiques, l'homéopathie et la phytothérapie constituent celles qui sont les courantes et officielles en particulier dans le continent européen. L'homéopathie est couramment employée dans le traitement de plusieurs maladies (Oberbaum and Cambar, 1994; Reinhart, 1998).

Dans le cadre de cette approche liée à l'application, lors de notre présente thèse, nous avons tenté de vérifier et de valider scientifiquement la bioactivité pharmacologique de trois médicaments homéopathiques : *Gelsemium sempervirens*, *Histaminum* et *Poumon histamine* sur différents aspects comportementaux de la souris, sur le niveau élevé de l'anxiété et sur le système immunitaire afin de mettre en évidence des effets uniques, couplés ou multiples.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. RAPPEL SUR L'ANXIÉTÉ

L'anxiété est définie comme un état émotionnel complexe, une combinaison des sentiments de peur, d'appréhension et d'inquiétude, souvent accompagnés par une instabilité ou une tension, associé à une anticipation appréhensive d'un futur danger probable (Öhman et al., 2000). Si dans le domaine de la recherche médicale humaine, il semble plus aisé de donner des échelles objectives à l'évaluation de l'anxiété chez l'homme, dans le domaine de la recherche expérimentale chez l'animal, il en va autrement et la difficulté réside sur l'absence d'interaction avec l'animal et également sur la seule observation de l'expérimentateur du comportement du sujet animal pour dégager et de manière arbitraire des indices pouvant lui permettre de mesurer le niveau de l'anxiété. Chez les rongeurs, l'anxiété est définie comme un niveau élevé d'appréhension d'un environnement nouveau et inconnu, et de la réaction accrue de la peur (Finn et al., 2003; Weiss et al., 2000). Lorsque l'anxiété devient anormalement intense, répétitive, prolongée et inéluctable elle peut présenter une forme pathologique, entraînant des comportements réprimés, des réponses négatives conditionnées, de mauvaises stratégies d'adaptation, et l'accroissement du niveau sympathique du système nerveux autonome (Craig et al., 2000).

Selon Leman et al. (2004) chez l'animal, l'anxiété comporte différents volets :

- un volet physiologique se traduisant par une activation d'origine nerveuse sympathique (accélération du rythme cardiaque, augmentation de la pression artérielle, etc.) et hormonal.
- un volet expressif comme des vocalisations d'alarme spécifiques, des expressions faciales, des postures défensives, des modifications du pelage ou du plumage, etc.
- un volet comportemental avec notamment des comportements appartenant au répertoire défensif comme la fuite ou le *freezing* et des inhibitions exploratoires.
- un volet subjectif (le « ressenti de l'émotion ») qui s'intègre dans le volet cognitif et très souvent spécifique à l'homme.

L'anxiété est considérée comme le mal du XXIème siècle et dont les effets néfastes vont de plus en plus progresser dans le modèle actuel de notre société. Elle affecte un huitième de la population totale du monde entier et est devenue un important domaine de recherche en neurobiologie et en psychopharmacologie au cours de ces dernières années (Eisenberg et al., 1998). Elle est génératrice de stress : l'hypervigilance et l'anticipation du danger mettent le sujet en constante alerte à la recherche de la présence d'hypothétiques stressseurs. Le stress est très étroitement lié à l'anxiété, et un sujet anxieux repère plus facilement les stressseurs. Dans de nombreux articles, les mots stress et anxiété se superposent. Les situations anxiogènes deviennent presque une sous catégorie des situations stressantes (Graziani, 2005).

Les réponses comportementales et physiologiques accompagnant l'anxiété préparent un individu à réagir de manière appropriée, par exemple, en révélant un comportement défensif ou offensif. Ainsi, l'anxiété permet à l'individu de sortir de danger et de l'éviter dans l'avenir, c'est-à-dire, de s'adapter aux défis de l'environnement (Livesey, 1986).

Selon Spielberger (1970), il existe différents types d'anxiété : l'anxiété « état », l'anxiété « trait » et l'anxiété pathologique.

I.1. L'anxiété « état »

Elle possède d'autres noms tels que l'anxiété contextuelle, l'anxiété situationnelle ou l'anxiété variable, l'anxiété environnementale (Lister, 1990; Belzung and Griebel, 2001; Graziani, 2005). Cette anxiété se rapporte à une émotion passagère liée à une situation limitée dans le temps et un environnement particulier. Elle est caractérisée par un éveil physiologique et par la perception de sentiments d'appréhension, de crainte et de tension (Graziani, 2005). L'intensité et la durée de l'anxiété « état » varient en fonction de l'interprétation (type et

persistance) et de l'événement (situation ou stimuli). Ce modèle peut être répétitif si les situations se reproduisent dans le temps. Par définition, l'anxiété « état » est une anxiété variable qui dépend de la nature du stimulus anxiogène (Belzung and Griebel, 2001). Lister (1990) a défini l'anxiété « état » comme une anxiété que le sujet éprouve à un moment donné et qui augmente en présence d'un stimulus anxiogène.

I.2. L'anxiété « trait »

Se rapporte à des caractéristiques relativement stables et spécifiques qui prédisposent les personnes à percevoir leur environnement et à y réagir de façon particulière et constante. Ce sont des dispositions latentes qui peuvent être activées par des circonstances et des situations appropriées (Graziani, 2005). L'anxiété « trait » définit le trait de la personnalité, c'est-à-dire, le tempérament anxieux habituel et endogène du sujet (Graziani, 2005). Lister (1990) a défini l'anxiété « trait » par le fait que c'est une anxiété qui ne varie pas d'un moment à un autre et qu'elle est considérée comme étant une caractéristique stable d'un individu et endogène dans le sens où elle relève des facteurs internes indépendamment des facteurs externes. Les études d'Endler (1997), montrent que pendant une confrontation stressante comportant une menace, l'anxiété « trait » agit comme une sorte d'amplificateur de l'anxiété « état ».

I.3. L'anxiété pathologique

C'est une émotion persistante, incontrôlable, excessive, inappropriée, et aversive, déclenchant des réponses physiologiques et comportementales dépourvues de valeur adaptative. Le comportement lié à l'anxiété pathologique est une réaction exagérée à l'anticipation ou à la perception des menaces, qui est disproportionnée à la situation réelle (Frauke et al., 2008).

Chez l'homme, l'anxiété pathologique est caractérisée par des inquiétudes et des soucis excessifs et qui se produit pendant au moins six mois. Deux conceptions opposées ont été proposées pour expliquer la relation entre l'état normal et l'état pathologique chez un sujet. La première propose que l'anxiété pathologique pourrait être considérée comme un excès quantitatif de l'anxiété normale. Tandis que la seconde propose que le passage de l'anxiété normale à l'anxiété pathologique résulte d'une variation qualitative, plutôt qu'une variation quantitative.

I.4. Les systèmes de neurotransmission régulateurs de l'anxiété

I.4.1. Le système GABAergique

L'un des éléments essentiels pour le contrôle de l'anxiété est l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). C'est le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau humain. Il est largement impliqué dans la modulation de la neurotransmission, notamment *via* la réglementation de l'excitabilité neuronale (Whittington et al., 1995; McCormick and Bal, 1997). Il exerce ses effets par interaction avec des récepteurs GABA. Fonctionnellement, l'inhibition synaptique rapide dans le système nerveux central des mammifères est médiée en grande partie par l'activation du récepteur de GABA_A (Tobler et al., 2001). Le récepteur actif est composé de cinq sous unités de protéines qui forment un canal chlorure qui reste fermé jusqu'à ce qu'il lie son ligand. Une activité GABAergique renforcée doit équilibrer l'excitation glutamatergique excessive, l'événement essentiel aboutit à la mort cellulaire (Allen et al., 2004). Son activité est liée à la conformation allostérique de son récepteur le complexe GABA_A (Bourin, 2004). Le neuromédiateur GABA produit ses effets physiologiques en agissant sur trois différents sous-types de récepteurs: GABA_A, GABA_B et GABA_C (Bormann, 2000). Les récepteurs GABA_A appartiennent à la famille des récepteurs membranaires couplés à un canal chlore. Il s'agit d'un complexe glycoprotéique transmembranaire formé de

plusieurs sous unités (Schofield et al., 1987). Il existe différentes isoformes dans chaque sous unité; 6 α , 4 β , 2 γ et 1 δ (Bourin, 2004).

Effet pharmacologique	Récepteur impliqué
Anxiolyse	Récepteurs avec α_2
Sédation	Récepteurs avec α_1
Amnésie antérograde	Récepteurs avec ou sans α_1

Tableau. 1. Le récepteur GABA_A d'après Bourin (2004)

Les récepteurs GABA_B, qui existent à la fois sur les locales pré et post synaptiques, sont métabotropiques couplés aux protéines G et influencent la neurotransmission inhibitrice lente de la signalisation de GABA *via* plusieurs modes du second messenger et les canaux ioniques Ca²⁺ et K⁺ (Bormann, 2000). Les récepteurs GABA_A ionotropiques, en revanche, produisent une transmission synaptique inhibitrice rapide par l'intermédiaire d'un canal chlorure intrinsèque. L'activation de récepteurs GABA_A augmente la conductance de Cl⁻, induisant une hyperpolarisation et réduisant l'excitabilité cellulaire (Oja et al., 1990). À l'heure actuelle, peu d'informations sur les événements médiés par le récepteur GABA_C. Le niveau d'activation intrinsèque des récepteurs GABA_A serait le régulateur principal de l'anxiété « trait ».

I.4.2. Le système sérotoninergique

Les neurotransmetteurs monoamines, c'est-à-dire, la sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT), la norépinéphrine et la dopamine jouent un rôle important dans l'anxiété (Wang et al., 2007). Le système sérotoninergique implique la 5-HT qui est considérée comme le neurotransmetteur le plus important impliqué dans l'anxiété. Il a été

démontré qu'un anxiolytique agissant *via* le système sérotoninergique cérébral diminue le taux de la 5-HT dans le cerveau (Hoyer et al., 2002; Wang et al., 2007; Caramaschi et al., 2007; Meneses et al., 2007). L'anxiété comme trouble psychique serait liée à une suractivité du système sérotoninergique central (Briley et al., 1990; Kahawara et al., 1993; Knobelmann et al., 2000). Plusieurs recherches suggèrent que la 5-HT peut jouer un rôle crucial dans la modulation des comportements liés à l'anxiété (Handley, 1995; Wang et al., 2007). En outre, plusieurs études ont suggéré que la 5-HT favorise l'anxiété (Iverson, 1984; Chopin et al., 1987; Traber et al., 1987). Les récepteurs de 5-HT sont divisés en 7 classes : de 5-HT₁ au 5-HT₇. Tous ces récepteurs sont couplés à la protéine G sauf 5-HT₃ qui est lié à un canal ionique. Les récepteurs 5-HT₁, 5-HT₂ et 5-HT₃ sont les récepteurs de sérotonine les plus importants (Hoyer et al., 2002). On distingue 5 sous-types de récepteurs 5-HT₁ et dont la fonction physiologique est inconnue pour certains. Les récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT_{1B} sont les récepteurs les plus connus et les plus importants des récepteurs 5-HT₁ (Hoyer et al., 2002). Les récepteurs 5-HT_{1A} constituent un mécanisme régulateur important du système sérotoninergique et sont impliqués dans le processus de régulation de l'anxiété et de la dépression. Les agonistes des récepteurs 5-HT_{1A} ont des propriétés anxiolytiques (Lanzenberger et al., 2007). Des études électrophysiologiques ont montré que l'activation des sous-types de récepteurs 5-HT₁ en l'occurrence 5-HT_{1A} produit l'hyperpolarisation (sortie de K⁺). La sérotonine agit dans ce cas comme messenger chimique inhibiteur. Cependant l'activation des récepteurs 5-HT₂ (5-HT_{2A/2B/2C}) produit la dépolarisation. La sérotonine agit dans ce cas comme messenger chimique exciteur. Les récepteurs 5-HT₂ ont une affinité moins grande pour la sérotonine ce qui fait que la sérotonine se fixe sur ces récepteurs quand les autres récepteurs (5-HT₁) sont saturés (Kettle et al., 1999, Meneses et al., 2007; Muller et al., 2007; Faerber et al., 2007). La grande disponibilité de la sérotonine pour les récepteurs 5-HT₂ et 5-HT₃ accroît l'anxiété et est probablement responsable au moins en partie des effets

anxiogéniques-like des antidépresseurs, tandis que le blocage des récepteurs 5-HT₃ produit des effets anxiolytiques (Faerber et al., 2007). Deux cas de figure : (1) l'antidépresseur peut agir en activant les 5HT₁ ; cela entraîne une anxiolyse avant les effets antidépresseurs. Cette anxiolyse lève l'inhibition comportementale générale et réduit le niveau de l'anxiété et de l'anticipation à la peur, ceci pourrait expliquer l'absence de la peur ou de l'anticipation d'un danger de mort qui se traduit par l'acte secondaire conséquentiel à la prise des antidépresseurs ou début de leur prise. (2) si l'antidépresseur agit sur les récepteurs 5HT₂ et 5HT₃ donc il y aura plutôt une action anxiogène qui traduit la première phase du traitement.

D'autres neurotransmetteurs que le GABA et la 5-HT sont aussi impliqués dans l'anxiété. Le rôle des récepteurs α -adrénergique dans le comportement (et en particulier le sous-type α_1) est moins connu et généralement considéré comme moins important. Ainsi, la noradrénaline est un neurotransmetteur responsable de la vasoconstriction et de l'augmentation de la fréquence cardiaque, son activation est aussi impliquée dans les comportements liés à l'anxiété et/ou l'inhibition. Son inactivation peut être reliée au soulagement de l'anxiété des animaux (Tanaka et al., 2000). La dopamine est aussi incriminée dans l'anxiété (Sullivan et al, 1999; Wang et al., 2007). Cependant, les liens entre les taux des neurotransmetteurs et l'anxiété ne sont pas totalement clarifiés (Wang et al., 2007).

II. RAPPEL SUR LE STRESS

II.1. Au niveau de l'organisme

La notion de stress a été introduite par l'endocrinologue canadien Hans Selye en 1936, en décrivant le Syndrome Général d'Adaptation. C'est une contre-réaction qui permet de restaurer l'équilibre menacé par une agression extérieure (Grenier-Boley, 2001). Le stress a été défini de diverses manières dans la littérature scientifique. Sur le plan psychologique, un stress apparaîtrait lorsque les exigences provenant de l'environnement surpasseraient la capacité adaptative d'un individu, ou son habilité à s'adapter (Cohen et al., 1995). Fréquemment appelé « stressseurs », ces exigences incluent les évènements négatifs de la vie comme la perte d'un emploi, la mort d'un être aimé ou les conflits familiaux. Dans cette conceptualisation du stress, les chercheurs ont établi une distinction entre stressseur aigu et stressseur chronique. Les stressseurs aigus sont limités dans le temps, avec une phase d'initiation ainsi qu'une phase de terminaison clairement définies. Par contre, les stressseurs chroniques sont continus et exposent l'organisme à une source permanente du stress, qui provoquent des réponses prolongées. Ces deux types d'agent stressseur ont été impliqués dans les changements de plusieurs paramètres biologiques et surtout immunitaires chez l'Homme, bien que le sens puisse varier selon le type de stressseur et l'état de santé de la personne (Seegerstrom and Miller, 2004).

Selon Steptoe et al. (2000), les effets du stress se manifestent au niveau physiologique, comportemental, cognitif et au niveau de l'expérience subjective de l'individu. Les effets physiologiques du stress comprennent des altérations au niveau du système neuroendocrinien, du système nerveux autonome et du système immunitaire. Les manifestations comportementales du stress comprennent des réponses d'agression, d'inhibition comportementale « *freezing* » et des activités de remplacement, de substitution ou de comportements addictifs telles que la consommation de tabac et d'alcool. Les manifestations

cognitives du stress comprennent des altérations au niveau du traitement de l'information, de l'attention et de la mémoire qui, en retour, influencent les performances et la capacité de prise de décision.

Les différents travaux de recherche ont donné lieu à quelques 120.000 articles sur le stress, toute discipline confondue. Après de nombreuses années de recherche il a été établi un lien entre le stress psychologique et les changements dans les fonctions organiques dont la fonction immunitaire (Herbert and Cohen, 1993; Segerstrom and Miller, 2004), cela a inauguré une nouvelle discipline au nom de Psycho-neuro-immunologie. D'autres travaux ont mis en évidence la contribution du stress dans l'induction ou l'exacerbation de différents désordres comportementaux tels que l'anxiété (Van Dijken et al., 1992; Adamec et al., 1997; Haller and Bakos, 2002), la dépression (Anisman and Zacharko, 1990; Cabib and Puglisi-Allegra, 1996) et dans les comportements compulsifs de reprise, après une période d'abstinence, de la consommation de substances toxicomanogènes telles que la cocaïne (Ahmed and Koob, 1997; Sinha et al., 1999; Shaham et al., 2000), l'héroïne (Shaham et al., 2000), la nicotine (Buezek et al., 1999) ou l'alcool (Lê et al., 1998).

II.2. Au niveau de la cellule

Les cellules des êtres aérobies, en état d'oxydoréduction normal, ont une concentration basale en ERO formées au cours des réactions cellulaires de métabolisme de l'oxygène. Le contrôle rigoureux de la formation et de l'élimination de ces dernières préserve les cellules de leurs effets nuisibles. Les cellules doivent l'homéostasie redox à l'équilibre entre la production des ERO et la capacité normale du système antioxydant à les détoxifier. Quand cet équilibre est rompu, en faveur de la production d'un taux élevé des ERO, il survient un stress oxydant dont les principaux dégâts sont la peroxydation lipidique, les lésions oxydatives des acides aminés et des protéines ainsi que les dommages oxydatifs de l'ADN.

Les dégradations oxydatives des biomolécules endommagent l'intégrité cellulaire et ses fonctions biologiques. Elles entraînent des dysfonctionnements tels que le changement de la perméabilité et/ou de la fluidité membranaire, l'inactivation de certaines enzymes, l'augmentation de plus de 10 fois la susceptibilité des protéines aux attaques protéolytiques, la mutation voire la dénaturation de l'ADN, la fragmentation de biomolécules ce qui peut conduire jusqu'à la mort cellulaire.

Des études récentes montrent que l'apparition du stress oxydant est principalement liée à la production incontrôlée des espèces radicalaires et de leurs dérivées secondaires, ainsi qu'à l'essoufflement des mécanismes de défenses cellulaires. Cette chute de l'activité antioxydante empêche la cellule de lutter contre les effets toxiques des ERO (Montuschi et al., 2004; Hong et al., 2004; Judge et al., 2005; Pak et al., 2006; Katalinic et al., 2006; Valko et al., 2007).

Le stress oxydant aboutit à des désordres biochimiques qui agissent comme un facteur déclenchant de certaines maladies, ou comme une cause de leur aggravation. Dans le cas du SIDA où la cause initiale ne fait pas intervenir de processus radicalaire, mais l'infection virale. Le virus VIH induit un stress oxydant qui réprime les gènes de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase, systèmes de défenses antioxydants, entraînant la mort des lymphocytes T par apoptose (Gil et al., 2003). En 1956, Harman relève pour la première fois que le vieillissement pourrait être l'œuvre des dommages oxydatifs moléculaires et cellulaires dus aux ERO formées au cours de la respiration cellulaire. Après la théorie radicalaire proposée par Harman, d'autres travaux ont été entrepris dans le but de confirmer cette hypothèse (Beckman and Ames, 1998). Le stress oxydant se présente aussi comme un des facteurs potentialisant l'apparition des maladies plurifactorielles telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer, les rhumatismes, les maladies cardio-vasculaires, etc.

(Montuschi et al., 2004; Hong et al., 2004; Judge et al., 2005; Pak et al., 2006; Katalinic et al., 2006; Valko et al., 2007).

III. RAPPEL SUR LE SYSTEME IMMUNITAIRE

III.1. Description générale

Le corps humain fait face tous les jours à des millions de microorganismes, de bactéries, de virus, ou autres. S'il ne disposait d'aucune défense, ces microorganismes auraient vite colonisé et parasité l'organisme, rendant sa survie impossible. L'organisme humain ou animal met en œuvre divers mécanismes de défense pour se protéger contre l'invasion massive des microorganismes ou des matières étrangères et réalisant l'immunité biologique. La nature de la réponse de l'organisme dépend du type de particules étrangères et de la voie d'entrée.

Les antigènes constituent les éléments étrangers au corps qui entraînent la formation d'anticorps et déclenchent une réponse immunitaire. On distingue les antigènes du soi (ceux qui sont normalement présents dans l'organisme et que le système immunitaire ne reconnaît plus) et les antigènes du non-soi (dont la présence est anormale dans l'organisme : éléments étrangers, éléments de l'organisme devenus anormaux). L'efficacité du système immunitaire est essentiellement fondée sur sa capacité à distinguer le soi du non-soi. De fait, lorsqu'il fonctionne de façon normale, la réponse immunitaire est dirigée contre les seuls antigènes du non-soi. Dans certains cas de dysfonctionnement, le système immunitaire ne reconnaît plus « le soi » et détruit les propres éléments de l'organisme en les considérant comme des agents étrangers, ce sont les maladies autoimmunes.

La réponse du système immunitaire implique trois processus: la reconnaissance de la particule étrangère, sa destruction et enfin la régulation de la réponse immunitaire à l'aide de cellules spécialisées et médiateurs (cytokines). Le système immunitaire répond par deux types de mécanismes : l'immunité non spécifique (ou naturelle ou innée) et l'immunité spécifique (ou acquise ou adaptative) impliquant des facteurs cellulaires et humoraux qui régulent la réponse à l'antigène. La réponse immunitaire non spécifique ou cellulaire est réalisée par les

phagocytes (monocytes/ macrophages et les neutrophiles) qui reconnaissent, neutralisent et détruisent les microorganismes pathogènes, alors que la réponse spécifique ou humorale est produite par les lymphocytes B sécrétant des anticorps et les lymphocytes T produisant des cytokines.

III.2. Reconnaissance immunitaire innée

La stratégie de la reconnaissance immunitaire innée est basée sur la détection des produits constitutifs et conservés du métabolisme microbien. L'immunité innée intervient en première ligne et s'oppose aux agents infectieux en faisant appel à des médiateurs cellulaires (polynucléaires neutrophiles, monocytes/macrophages, système réticulo-endothélial, mastocytes, NK, ...) et humoraux (Ig,...). Les cellules impliquées sont porteuses de récepteurs spécifiques de certains motifs moléculaires communs à différents micro-organismes : ainsi les récepteurs TOLL reconnaissent des motifs de micro-organismes baptisés et appelés PAMPs (pathogen associated molecular pattern).

III.3. Reconnaissance immunitaire adaptative

La reconnaissance immunitaire adaptative se fonde sur la génération d'un répertoire aléatoire et fortement divers, des récepteurs d'antigène, des récepteurs des cellules T et B (RCT et RCB), suivie d'une sélection et d'expansion clonale des récepteurs avec des spécificités appropriées. L'immunité adaptative intervient secondairement après une phase de reconnaissance de l'antigène, de prolifération lymphoïde et de différenciation en cellules productrices d'anticorps (lymphocytes B / plasmocytes) et de cytotoxicité (lymphocytes TCD4, TCD8 et TCD3⁺). Cette immunité adaptative est douée de mémoire et un deuxième contact avec l'antigène permet une réponse rapide et puissante de type secondaire.

Type	Composants innés	Composants acquis
- Solubles	Compléments Composants de phase aiguë Lysozyme Interféron α et β IL1, TNF, IL6	Immunoglobulines IgG, IgA, IgM, IgE, IgD
- Cellulaires	Phagocytes Polynucléaires Monocytes/macrophages SRE NK (CD16 ⁺ CD56 ⁺ Leu7 ⁺)	Lymphocytes T (CD3 ⁺ CD4 ⁺) Helper (CD3 ⁺ CD8 ⁺) cytotoxique suppresseur Lymphocytes B (CD19 ⁺ CD20 ⁺ CD22 ⁺)

Tableau 2. Principaux moyens de défense de l'organisme

III.4. Les cellules du système immunitaire

III.4.1. Les lymphocytes T et B

Les lymphocytes T et B sont des cellules immunitaires dont la maturation se produit respectivement dans le thymus et la moelle osseuse. Ils représentent les cellules effectrices de l'immunité spécifique, leur immunocompétence dépend de leur capacité à synthétiser un récepteur membranaire reconnaissant spécifiquement un antigène. Ils sont impliqués respectivement dans la réponse à médiation cellulaire et humorale.

Les lymphocytes T se différencient en lymphocytes T auxiliaires (CD4⁺) ou Th (helper) qui jouent un rôle pivot dans l'immunomodulation, et en lymphocytes T cytotoxiques (CD8⁺) détruisant les cellules infectées. Les cellules Th se subdivisent en deux groupes, les Th₁ et les Th₂. Les cellules Th₁ dirigent l'immunité cellulaire qui permet d'éliminer les pathogènes intracellulaires (ex.: virus) et les cellules cancéreuses, et de prévenir les réactions d'hypersensibilité de la peau (Pulendran, 2004). Tandis que les cellules Th₂ dirigent

l'immunité humorale permettant la destruction des organismes extracellulaires grâce aux anticorps sécrétés. L'équilibre entre les deux sous populations de lymphocytes T permet de maintenir une homéostasie fonctionnelle générant une réponse immunitaire appropriée (Kidd, 2003). D'autres sous populations de lymphocytes T, appelées cellules T régulatrices ($CD4^+CD25^+$), comme T_r et T_{h3} , ont été récemment décrites (Allez and Mayer, 2004; Rook and Brunet, 2005). Elles jouent un rôle dans le maintien de la tolérance et peuvent être induites contre les antigènes bactériens, viraux et parasitaires. Elles peuvent également prévenir les immunopathologies induites par les infections ou l'effet de la persistance prolongée du pathogène par suppression de la réponse de type T_{h1} (McGuirk and Mills, 2002).

Les lymphocytes T et B montrent une parfaite collaboration dans leur fonction. Les lymphocytes T sont activés grâce aux cellules présentatrices de l'antigène (CPA) (les cellules dendritiques, les cellules B et les monocytes/macrophages). Les lymphocytes B sont ensuite activés à leur tour par les lymphocytes T_{h2} pour se différencier en plasmocytes et produire des anticorps (Hodgkin et al., 1998). Les lymphocytes T reconnaissent des antigènes sous forme de peptides liés au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des CPA. Les cellules T_h reconnaissent seulement les peptides liés aux molécules du CMH classe II (ex. peptides d'origine bactérienne) alors que les lymphocytes T cytotoxiques identifient uniquement les peptides liés aux molécules du CMH classe I (ex. peptides d'origine virale) (Chamberlain, 2002). Par contre, les lymphocytes B reconnaissent différents types d'antigènes comme les protéines, les acides nucléiques, les polysaccharides, certains lipides et des haptènes (petites molécules organiques) grâce à des récepteurs liés à la surface cellulaire. Après la destruction de l'antigène, la réponse immunitaire diminue, alors que les lymphocytes B mémoires persistent pour répondre rapidement au même antigène lors d'une éventuelle réintroduction dans l'organisme (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005).

III.4.2. Les granulocytes

Les granulocytes sont des globules blancs majoritaires du sang. On distingue trois types de granulocytes différents par leur granulation interne et par leur fonctionnement, les éosinophiles, les basophiles et les neutrophiles. Les granulocytes ont un rôle central dans l'immunité innée particulièrement dans la défense anti-bactérienne (Rinaldi et al., 2007). La fonction principale des granulocytes basophiles et éosinophiles est la réponse inflammatoire allergique. Les granulocytes éosinophiles sont aussi connus pour leur rôle dans l'immunité antiparasitaire. Les granulocytes basophiles représentent la source principale d'histamine. Ils jouent un rôle important dans l'hypersensibilité à médiation cellulaire (type IV). Les granulocytes neutrophiles sont le type de granulocytes le plus important car ils sont des redoutables phagocytes.

III.4.3. Les monocytes/macrophages

Les monocytes sont les plus gros des globules blancs. Ils ont un fort potentiel de phagocytose et une mobilité très élevée. Les monocytes se multiplient et s'activent en cas d'infection chronique. Ils interviennent très efficacement dans la lutte contre les virus et contre certains parasites et bactéries situés à l'intérieur des cellules. Ils participent, avec les lymphocytes, à la défense de l'organisme par l'intermédiaire du système immunitaire. L'augmentation du nombre des monocytes appelée également monocytose se rencontre lors des infections, des hémopathies et aussi dans d'autres maladies.

III.4.4. Les cytokines : propriétés et activités

Les cytokines sont des médiateurs chimiques assurant la communication entre les cellules et pouvant affecter plusieurs éléments du système immunitaire. Ce sont des molécules de nature glycoprotéique sécrétées en cascade par les cellules immunitaires en réponse à un stimulus, elles méditent et régulent l'immunité, l'inflammation et l'hématopoïèse. Les

cytokines agissent rapidement et à de très faibles concentrations sur les cellules cibles en se liant spécifiquement à un récepteur membranaire par lequel un signal (activation de tyrosine kinase) est transmis à la cellule pour induire l'expression d'un gène (Townsend and McKenzie, 2000; Ollier, 2004). Les cytokines comprennent les lymphokines (lymphocytes), monokines (monocytes), chémokines (substances chimiotactiques), et interleukines (produites par un leucocyte et agissent sur un autre).

Une cytokine peut avoir trois types d'action : (1) action autocrine en agissant sur la même cellule, (2) action paracrine en agissant sur les cellules avoisinantes et (3) action endocrine en agissant sur les cellules distantes de la phase précédente. Le type de cytokine produite est variable selon la sous population de lymphocytes Th stimulée. Les cellules effectrices (Th₁ ou Th₂) produisent des cytokines soit « pro-inflammatoires », soit « anti-inflammatoires ». Par contre, les cellules régulatrices (Th₃ ou Tr₁) secrètent des cytokines qui inhibent l'une ou l'autre des réponses générées par les cellules effectrices (Monteleone et al., 2002). Les effets exercés par les cytokines peuvent être synergiques ou antagonistes. En général, les cytokines stimulent la prolifération et la différenciation des cellules immunitaires (Townsend and McKenzie, 2000; Pyo et al., 2003).

III.4.5. Les Immunoglobulines (anticorps): propriétés, production et activités

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines produites par les lymphocytes B en réponse à une substance immunogène. Chaque anticorps se lie spécifiquement à un déterminant antigénique (épitope).

Selon la séquence en acides aminés de la région constante des chaînes lourdes et la fonction immunitaire, on distingue plusieurs classes (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE) et sous-classes (IG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂) d'anticorps. La différence entre les séquences en acides aminés de la région constante des chaînes courtes permet de distinguer deux types d'Ig (Ig à chaîne légère κ ou λ) et des sous-types (λ ₁, λ ₂, λ ₃, λ ₄). La région hyper variable des Ig

permet la reconnaissance de l'antigène, alors que leur partie commune permet de fixer le complément (protéines du sérum) qui est activé pour lyser l'antigène, de lier l'anticorps aux cellules (phagocytes et tueuses), et de traverser l'épithélium. La production des anticorps par les cellules B dépend des cytokines sécrétées par les lymphocytes T. La biosynthèse des IgG_{2a} est favorisée par les cytokines sécrétées par les cellules de type Th₁, tandis que la production de IgE et IgA est induite par les cytokines issues des cellules de type Th₂ (Kaminogawa, 1996).

Les anticorps IgG ont une grande demi-vie et sont plus abondants dans le sérum humain où ils représentent plus de 85 % des anticorps totaux. Les IgA sont sécrétées principalement au niveau des muqueuses, alors que leur production dans le sang est réduite (7 % - 15 % des anticorps totaux). En revanche, les IgM, IgD et IgE sont faiblement synthétisées (Metzger, 1970; Kerr, 1990).

	Rôle	Augmentation	Diminution
IgA	agglutination, neutralisation des bactéries, virus	dans les cirrhoses et certains myélomes, Syndrome de Wiskott-Aldrich,	dans les maladies intestinales exsudatives, Syndrome d'ataxie-télangiectasie,
IgE	Déclenche la libération de produit participant à la réaction inflammatoire, et d'histamine entrant dans la réaction allergique. neutralisation de parasites	en cas d'allergie grave, et en présence de parasites (parasitose) dans le tube digestif,	Hypogammaglobulinémie à expression variable
IgG	protègent l'organisme contre les bactéries, les virus, et les toxines qui circulent dans le sang et la lymphe	dans les syndromes inflammatoires, les cirrhoses et certains myélomes,	Syndrome d'ataxie-télangiectasie Hypogammaglobulinémie congénitales ou acquises

Tableau 3. Rôle des Immunoglobulines (A, E et G)

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Objectifs du travail

En fait, une fonction correcte et des interactions adéquates entre les trois principaux systèmes régulateurs, qui sont, le système nerveux, endocrine et immunitaire, sont cruciales pour le maintien de l'homéostasie donc de la santé (Viveros et al., 2007). Le système neuro-immune implique une interaction neuro-immunitaire bidirectionnelle avec les deux voies neuro-endocrine et neuronale s'impliquant elles-mêmes dans le contrôle de la réponse immunitaire humorale et cellulaire (Wrona, 2006). Si le système nerveux se trouve impliqué dans un double sens du niveau de la régulation des systèmes immunitaire et endocrine, cela implique que toute atteinte du SNC aurait des conséquences indirectes sur les fonctions immunitaires et endocrines mais aussi toute atteinte du système immunitaire ou du système endocrine serait potentiellement génératrice des troubles nerveux également. Il est admis que le système nerveux est le siège d'une importante interface entre l'environnement extérieur et celui de l'intérieur. Les différents phénomènes, objectifs comme subjectifs, pouvant affecter cette interface, sont susceptibles d'induire des modifications de la fonction nerveuse et par conséquent immunitaire et endocrine. L'exposition à des situations anxiogènes est connue pour susciter une activation robuste des systèmes neuroendocriniens impliqués dans la réponse au stress, tels que l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et le système nerveux autonome (Lader, 1980; Hoehn-Saric and McLeod, 2000). C'est à travers ce schéma que nous avons tenté de mettre en évidence de manière expérimentale et dans une première phase si les perturbations au niveau de l'anxiété pourraient avoir un impact sur les fonctions nerveuses et immunitaires. Dans une deuxième phase, nous avons également tenté de comprendre et d'explorer les mécanismes cellulaires et aussi moléculaires qui seraient sous-jacents à ces perturbations fonctionnelles au niveau des cellules immunitaires et des cellules nerveuses (neurones et cellules gliales).

Nous nous sommes ainsi intéressés, dans une première partie et dans une expérience préliminaire à la détermination de la nature de l'anxiété présente chez la souris. Afin de procéder à l'évaluation du niveau de l'anxiété, nous avons utilisé un test spécifique et validé scientifiquement, le test de la chambre claire/obscur (CCO). Ce test s'avère par sa simplicité de manipulation et par sa fiabilité comme le plus adéquat à notre travail, car il appartient à la catégorie des tests dits contraignants, considéré comme un modèle d'anxiété chez l'animal et largement utilisé dans l'évaluation pharmacologique des effets des substances sur l'anxiété (Belzung et al., 1989; Costall et al., 1989; Misslin et al., 1990; Griebel et al., 1992; Bouayed et al., 2007a). Après un tri et une distinction des souris anxieuses et des souris non anxieuses, notre travail a porté dans une première étape, à la recherche et à l'évaluation de l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, lymphocytes TCD4⁺, lymphocytes TCD8⁺ et cellules NK) et de l'immunité humorale (immunoglobulines A, E et G) chez la souris Swiss et selon le niveau d'anxiété stable établi préalablement. Nous avons par ailleurs tenté d'exposer les animaux à une source de stress qualifié et considéré comme anxiogène (test de stress par contention en aigu et subaigu) afin de vérifier l'impact d'un stress anxiogène selon le niveau d'anxiété sur les différents facteurs étudiés.

Au sein de notre équipe, des études de corrélation entre le niveau d'anxiété et le niveau du statut oxydatif intracellulaire ont déjà été réalisées surtout au niveau des cellules périphériques en particulier les granulocytes (Bouayed et al., 2007b). À la lumière de ces résultats obtenus, et dans une étape complémentaire, nous avons projeté de procéder à l'évaluation de l'impact du niveau d'anxiété, établi selon le protocole déjà validé, sur le statut oxydatif des cellules leucocytaires (granulocytes, lymphocytes et monocytes) du sang périphérique des souris pour pouvoir donner une suggestion expliquant l'effondrement de certaines cellules immunitaires étudiées surtout que le stress oxydatif est l'un des facteurs déclanchant ces impacts. Ensuite, dans une étape suivante, nous nous sommes intéressés à

l'éventuel impact que peut engendrer l'anxiété en parallèle sur le système nerveux central et sur le système immunitaire. En réalisant une étude complémentaire visant la détermination du lien entre le niveau d'anxiété et le statut oxydatif des cellules nerveuses (neurones et cellules gliales) prélevées à différentes régions du cerveau (cervelet, cortex cérébral et hippocampe) et des cellules leucocytaires périphériques des mêmes souris. Ceci est dans le but de déterminer si le niveau d'anxiété stable élevé affectait en même temps le système immunitaire et le système nerveux central.

A partir du moment où les effets de l'anxiété stable ont été mesurés sur le système immunitaire et sur le système nerveux, nous avons tenté d'apporter une source de stress supplémentaire afin d'étudier l'effet couplé d'une anxiété « trait » stable permanente et chronique avec une source anxiogène supplémentaire.

L'établissement des différents troubles fonctionnels mis en évidence avec l'anxiété « trait » stable nous a aussi interpellés sur le rôle des principaux récepteurs impliqués dans l'anxiété et en particulier les récepteurs GABA_A. C'est dans cet objectif que nous avons procédé à l'évaluation du niveau d'expression des gènes codants de différents récepteurs (GABA_A, α_1 -adrénergiques, μ -opioïdes et 5-HT_{1A}). Cette approche pourrait nous permettre de suggérer s'il existe un lien entre le niveau d'expression des récepteurs et l'état oxydatif cellulaire. Les hypothèses qui ont guidé ce travail sont les suivantes :

- 1) y-a-t-il de manière valide un lien entre l'anxiété et les troubles fonctionnels immunitaires et nerveux ?
- 2) quel type d'anxiété est concerné par ce lien ? Anxiété « état » ou anxiété « trait » ?
- 3) la rupture de l'équilibre du statut oxydatif cellulaire pourrait être le mécanisme expliquant l'atteinte des fonctions immunitaires et comportementales étudiée et induite par les troubles de l'anxiété ?

D'un point de vue applications des résultats et des validations de toutes ces démarches, nous nous sommes aussi intéressés à l'état des lieux bibliographiques sur l'efficacité prouvée et démontrée des produits et médicaments homéopathiques choisis pour ces études. Ainsi, nous avons relevé que les banques de données bibliographiques disposent de nombreux articles concernant la recherche en homéopathie et dont quelques rares articles qui ont traité la variable immunitaire de manière expérimentale en particulier liée à l'anxiété et le stress oxydant. C'est pourquoi, l'originalité de notre travail de recherche sur les médicaments homéopathiques a été la recherche des effets des faibles doses des médicaments homéopathiques, sur le comportement et sur les paramètres immunitaires déjà cités chez des souris ayant des niveaux d'anxiété opposés. Cette approche permet de déterminer les effets neuroactifs, immunotropes ou antioxydants des substances naturelles et des produits étudiés (médicaments homéopathiques).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Animaux et conditions d'hébergement

Les animaux utilisés au cours de ce travail sont des souris SWISS mâles âgées de 10 semaines au moment des tests comportementaux. Ces animaux proviennent du centre d'élevage Charles River, France. Cette souche a été choisie parce qu'elle ne comporte aucune particularité et se rapproche le plus des conditions naturelles et normales pour l'espèce étudiée. Il aurait été possible de travailler sur des souches sélectionnées génétiquement mais nous voulions rester le plus proche des conditions réelles et naturelles.

L'utilisation des individus mâles est justifiée par le fait que, contrairement aux femelles, ils ne sont pas soumis à des cycles hormonaux qui pourraient induire des variations de comportement et donc réduire l'homogénéité des individus constituant les lots initiaux.

Dès leur réception, les souris sont placées en groupe de 5 dans des cages standard pour une période d'acclimatation d'une semaine à dix jours avant d'être utilisées dans les différentes expériences. Pendant cette période, les souris sont maintenues dans une animalerie à température constante ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) et sous un cycle de lumière/obscurité de 12/12 h, et ont un accès libre à la nourriture et à l'eau. En raison de l'activité nocturne des souris, la lumière s'éteint à 6 h du matin et se rallume à 18 h et les différentes expériences ont lieu de 7 h à 16 h. Toutes les expériences effectuées sur les souris sont réalisées dans une pièce spécialement conçue pour l'expérimentation animale et en conformité avec les directives du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

II. Evaluation comportementale du niveau d'anxiété stable

II.1. Test de la chambre claire/obscurité (CCO)

La chambre claire/obscurité consiste en une boîte (45 X 27 X 29 cm). Ce dispositif est subdivisé par des lignes en 15 cases de surface égale (9 X 9 cm). Il est divisé en deux

compartiments, un compartiment obscur : 27 X 18 X 29 (6 cases) et un compartiment éclairé : 27 X 27 X 29 (9 cases). Les deux compartiments communiquent par une petite ouverture permettant le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Le compartiment obscur est éclairé par une lumière rouge alors que le compartiment éclairé est illuminé par une lumière blanche.

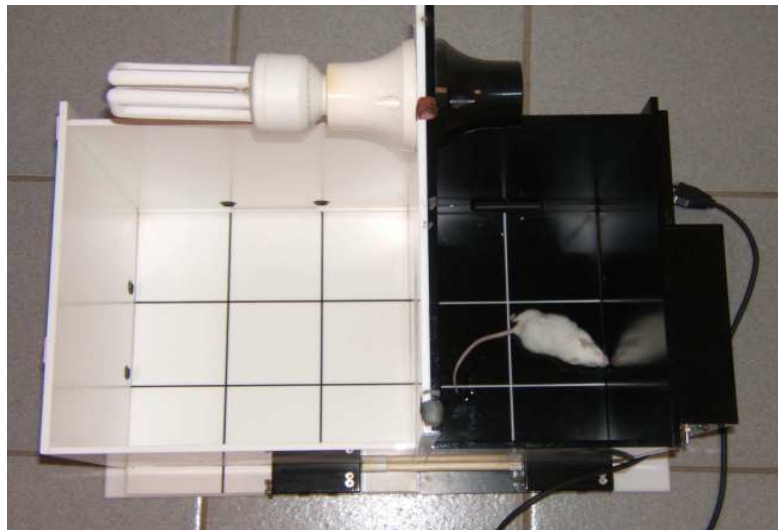


Photo 1 : dispositif du test de la chambre claire obscure

II.2. Procédure expérimentale

Au moment du test, la souris est placée face à l'ouverture joignant le compartiment obscur. Son comportement est alors observé pendant 3 minutes. Après chaque test, le dispositif est nettoyé avec une solution d'éthanol à 10 % pour éliminer toutes traces de passage de l'animal précédemment testé. Nous avons pris en compte trois variables qui sont considérées comme indicateur du niveau d'anxiété des différents individus et validés scientifiquement par plusieurs auteurs (Crawley et al., 1980; Crawley, 1981; Misslin et al., 1989; Belzung et al., 1994; Belzung, 1999; Bourin and Hascoët, 2003; Bouayed et al., 2007a,b; Rammal et al., 2008a,b) :

- a) le temps de latence : correspond au temps mis par la souris dans le compartiment obscur avant sa première transition vers le compartiment éclairé.
- b) le nombre de transitions (sorties) du compartiment obscur vers le compartiment éclairé.
- c) le temps cumulé dans le compartiment éclairé (TCC).

Toutes ces mesures sont comptabilisées après la première entrée de l'animal dans le compartiment obscur durant les 3 minutes de l'expérience.

Une fois toutes les souris passées au test, celles qui sont considérées anxieuses présentent un temps de latence élevé (plus de 120 sec), un temps cumulé dans le compartiment éclairé faible (de 0-14 sec) et un nombre de transitions faible (de 0-2 sec). Les souris sont qualifiées non-anxieuses quand le temps de latence est bas (de 5-30 sec), le temps cumulé dans le compartiment éclairé est élevé (de 70-100 sec) et le nombre de transitions est élevé (de 8-12 sec).

En se basant sur ces critères sévères, seulement 10 % des souris ont été considérées comme anxieuses et 10 % comme non-anxieuses sur un échantillon d'une population de 100 souris. Ainsi, 80 % des souris intermédiaires (I) ont été mises en observation pour d'autres études.

Afin d'évaluer les effets du niveau de l'anxiété sur différents paramètres aussi bien immunitaires que comportementaux et oxydatifs, les souris anxieuses et les non-anxieuses sont distinguées, un lot de 10 souris de chaque groupe est sacrifié afin de récupérer les cellules périphériques au niveau du sang servant aux différents dosages immunitaires (cytométrie en flux et ELISA) et les cellules centrales (neurones et cellules gliales) au niveau de chaque partie du cerveau.

III. Evaluation des effets du stress expérimental sur les animaux selon leur niveau d'anxiété

III.1. Principe

Le modèle de stress utilisé au cours de ce travail correspond au stress par contention ou réduction maximale de l'espace (appelé également par immobilisation, contrainte, ou confinement). Ce modèle induit un stress physique à prédominance émotionnelle (Stöhr et al., 1999). D'autres chercheurs l'ont considéré comme un stress psychologique (Servatius et al., 2000; Dayas et al., 2001; Schmitz et al., 2002; Madrigal et al., 2003) dans le sens où le malaise, la gêne ou l'inconfort provoqués par la contention sont secondaires à l'appréciation ou l'évaluation cognitive de l'incapacité de se mouvoir. Ce modèle présente, en plus de sa validité scientifique, un aspect éthique acceptable par la communauté scientifique.

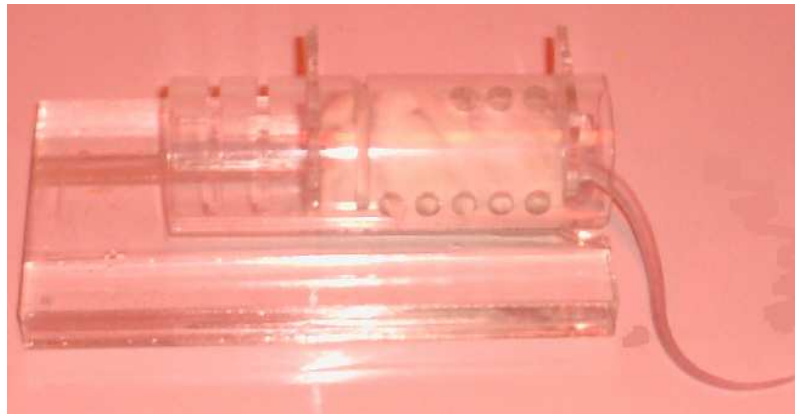


Photo 2 : Dispositif du stress par contention

Le dispositif du stress par contention consiste en un tube cylindrique en Plexiglas de 3 cm de diamètre adapté à la souris. Tout au long de ce cylindre, sont disposées plusieurs petites fentes munies de petites portes guillotines permettant un ajustement de l'espace à la taille de l'animal.

III.2. Procédure de l'application du stress par contention

Des applications de stress aigu (2h) et subaigu (15 jours) ont été réalisées au cours de ce travail. Lors de la séance du stress, la souris est introduite dans ce tube pendant une seule durée de deux heures (Dayas et al., 2001; Madrigal et al., 2003; Schmitz et al., 2002), ou plusieurs fois quotidiennement et à la même heure durant 15 jours et l'immobilisation totale au sein de ce cylindre est obtenue par une réduction maximale de l'espace grâce aux portes guillotines. Immédiatement après la distinction des souris selon leur niveau d'anxiété par le test de la CCO, elles sont exposées au stress par contention pendant deux heures. Un lot de 10 souris de chaque groupe (anxieux et non-anxieux) a été anesthésié par l'halothane puis décapité. Le sang a été recueilli dans des tubes héparinisés pour servir aux différents dosages immunitaires.

D'autres lots de souris (anxieuses et non-anxieuses) ont été exposés quotidiennement à 2 h de stress par contention jusqu'à J15 où leur niveau d'anxiété a été de nouveau vérifié par le test de la CCO. Ils ont été ensuite décapités et leur sang recueilli pour différents dosages immunitaires.

IV. Evaluations immunitaires

IV.1. Technique de la cytométrie en flux pour le typage cellulaire

IV.1.1. Définition

La cytométrie en flux est une technique utilisée pour la caractérisation individuelle des particules en suspension après leur excitation lumineuse (Belloc F., 1991). C'est une technique permettant de réaliser des études antigéniques fonctionnelles sur différents types de cellules eucaryotes et procaryotes (Shapiro, 2003). L'avantage de cette technique est sa capacité de mesurer plusieurs paramètres sur plusieurs milliers de cellules individuelles dans une période très courte (jusqu'à 10.000 événements/s) par la mesure de leur fluorescence et de

la manière dont ils dispersent la lumière. Ainsi, une reproductibilité élevée et une précision statistique sont assurées par cette analyse. En plus du comptage cellulaire, de la séparation des sous population cellulaires et du tri cellulaire, la cytométrie en flux peut aussi servir à l'étude de la mortalité cellulaire, de l'apoptose, de la flambée respiratoire, de la phagocytose, du statut oxydatif cellulaire, de l'activité antioxydante (dosage des ERO, glutathion, etc.), du dosage des hormones, etc. (Goedken et al., 2004; Hong et al., 2004; Gagnaire et al., 2006; Bouayed et al., 2007a; Yin et al., 2007; Csaba et al., 2007; Rammal et al., 2008a,b).

IV.1.2. Principe

Les cellules en suspension dans l'échantillon sont acheminées dans la chambre d'écoulement par une pression de gaz où arrive aussi un liquide d'entraînement. Elles sortent de la chambre d'écoulement par une buse et passent ensuite une à une devant la source d'excitation lumineuse qui permet de mesurer ou d'évaluer des paramètres cellulaires. Ainsi, la lumière diffractée sous un petit angle ($< 12^\circ$) mesurée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre Forward Scatter (FSC)). La lumière diffractée, mesurée à 90° (paramètre Side Scatter (SSC)) donne une mesure de la granulosité de la cellule. Ces cellules émettent alors différents types de signaux lumineux qui sont transformés en des signaux électriques analogiques qui seront ensuite convertis en des signaux numériques. Ces signaux sont enregistrés pour chaque cellule, pour chaque paramètre, constituant ainsi un fichier informatique (Photo 3). Chaque point représente une seule cellule classée selon les valeurs corrélées des deux paramètres cités. Ainsi, le type de graphique portant le nom de "diagramme de dispersion" ("dot plot") constitue la représentation fondamentale des données de cytométrie (Photo 4).

En utilisant cette technique, nous avons déterminé le nombre des granulocytes, des monocytes, des lymphocytes totaux, lymphocytes TCD4⁺, TCD8⁺ et cellules NK dans 10 000

événements dans le sang de la souris. La caractérisation des lymphocytes TCD4⁺, TCD8⁺ et NK a été faite par des anticorps monoclonaux antiCD4 (PerCP), antiCD8 (PE) et antiNK (FITC).

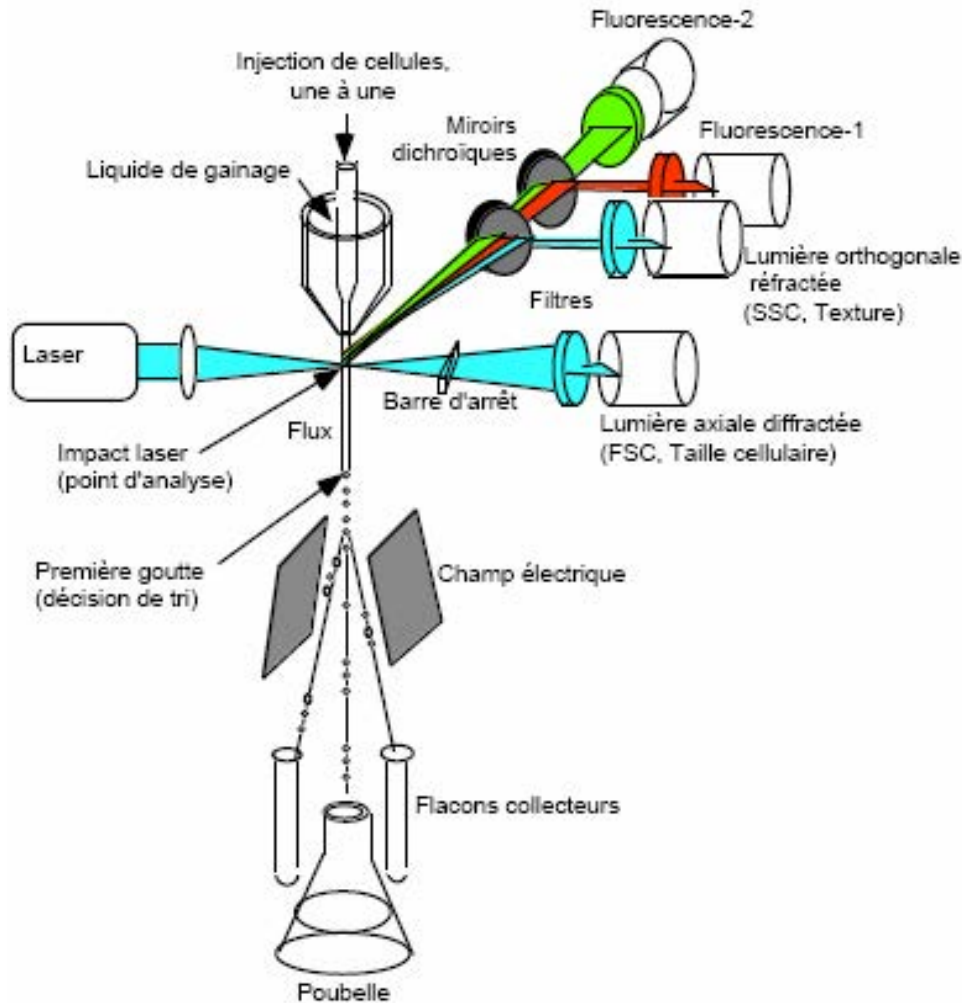


Photo 3. Principes de fonctionnement d'un cytomètre-trieur à flux.

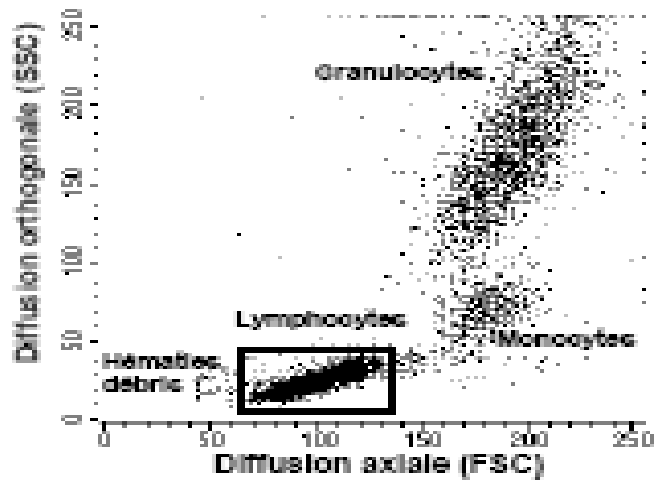


Photo 4. Identification morphologique des leucocytes du sang périphérique de la souris en fonction de leur taille (FSC) et de leur granulosité (SSC).

IV.1.3. Méthodologie

IV.1.3.1. Préparation du sang

À 100 μ l de sang contenu dans chaque tube eppendorf, nous ajoutons 5 μ l de chaque anticorps antiCD4⁺, antiCD8⁺ et antiNK préalablement dilués en introduisant 20 μ l d'anticorps dans 30 μ l d'eau distillée (recommandé par le fabricant), petite agitation et nous les mettons 15 minutes à l'obscurité, à température ambiante. Pour détruire les globules rouges, 2 ml de la solution de lyse (BD FACS™ Lysing Solution) sont ajoutés dans chaque tube avant d'agiter doucement et les mettre 10 minutes à l'obscurité, à température ambiante. Ensuite, après une centrifugation (5 min, 2000 tr/min à 4°C), le surnageant est jeté et 2 ml de la solution de lavage (BD CellWASH) sont ajoutés dans chaque tube. Nous agitons bien à l'aide du Vortex puis nous procédons à une deuxième centrifugation dans les mêmes conditions. Nous jetons le surnageant et nous ajoutons 500 μ l de solution de lavage afin de réaliser les dosages immunitaires sur le cytomètre FACScan.

IV.2. Technique E.L.I.S.A pour les dosage des immunoglobulines A, E et G

IV.2.1. Introduction

ELISA est un test immunochimique rapide qui implique une enzyme, un anticorps ou un antigène. C'est une technique biochimique universellement acceptée en tant qu'une technique standard pour la mesure des taux d'anticorps dans beaucoup de fluides biologiques et différentes espèces. Elle utilise deux anticorps, l'un d'entre eux étant spécifique à l'antigène et l'autre étant couplé à une enzyme. Le second antigène confère à l'essai son nom de "enzyme-linked" = lié aux enzymes, et provoquera chez un substrat chromogène ou fluorogène la production d'un signal.

Les tests ELISA sont extrêmement sensibles et spécifiques et se comparent favorablement avec d'autres méthodes utilisées pour détecter des substances dans le corps, tel que des essais de l'analyse de radio immune (Ginel, 1997). Ils ont les avantages supplémentaires de ne pas avoir besoin des radio-isotopes ou d'un compteur coûteux de rayonnement.

IV.2.2. Méthodologie

IV.2.2.1. Courbes d'étalonnages

Dans le but de déterminer le taux des anticorps présents dans le sérum d'une souris, nous avons effectué une série d'expérimentations avec différentes dilutions (1/1000, 1/2500, 1/5000, 1/10000) des différents types d'anti-Ig couplés à la peroxydase dans le PBS 1X pour tracer une courbe d'étalonnage nous permettant la détermination de la concentration des anticorps. Après cette expérimentation, nous avons choisi la dilution à 1/5000.

IV.2.2.1.1. Procédure

On procède à un « Coating » par triplicata, les puits de la plaque sont enduits par 100 μl du tampon carbonate-bicarbonate et par différentes concentrations des IgA, IgE et IgG. On incube une nuit à 4 °C. Ensuite, on lave deux fois avec du PBS 1X-Tween 20 à 0.05 %. On sature la plaque avec de BSA à 1 %, cette opération dure 1 h 30 à 37 °C, après on rince deux fois avec du PBS 1X-Tween 20. On ajoute 50 μl des anti-Ig (A, E et G) couplés à la peroxydase et dilués dans le PBS 1X. L'incubation dure 1 h à 37 °C. On lave deux fois avec du PBS 1X-Tween 20 et on ajoute 50 μl de TMB qui est un substrat de la peroxydase. On couvre la plaque et on la met à l'abri de la lumière à température ambiante. La réaction enzymatique est arrêtée 15-30 minutes plus tard par l'ajout de 50 μl d'acide sulfurique 3 M. Ensuite la plaque est laissée à température ambiante pendant 5 minutes afin d'être lue grâce à un lecteur de type {MRX, Microplate Reader}. L'absorbance (DO) est mesurée à 460 nm.

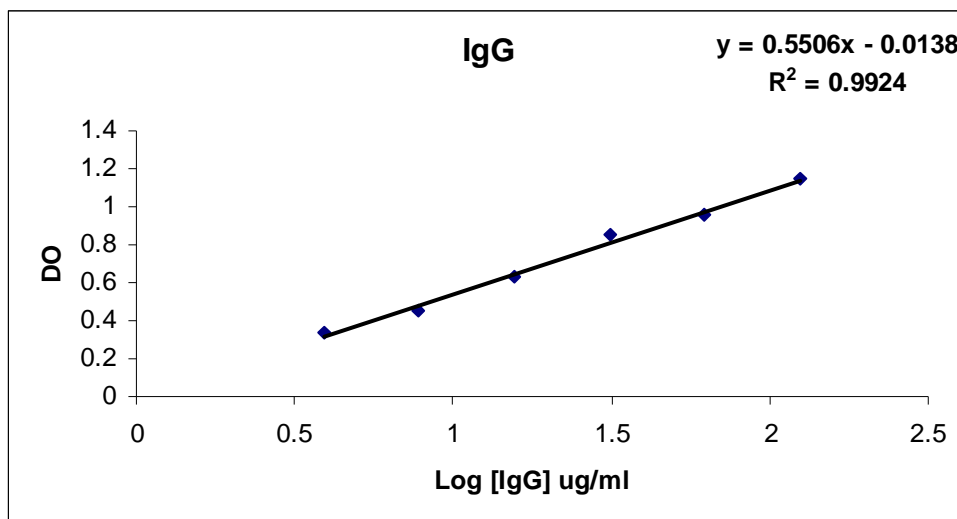


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'IgG. Les données affichées correspondent à la moyenne de trois répliques.

DO	1.1436	0.9553	0.8513	0.627	0.4486	0.3323
log [IgG]	2.09691001	1.79588002	1.49485002	1.19382003	0.89279003	0.59176003

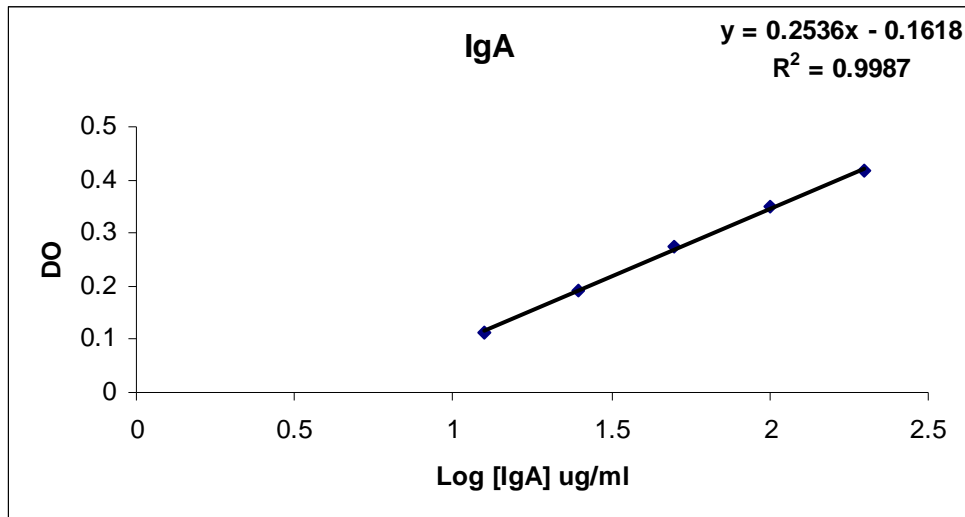


Figure 2. Courbe d'étalonnage de l'IgA. Les données affichées correspondent à la moyenne de trois réplifications.

DO	0.4173	0.348	0.2753	0.1906
Log [IgA]	2.30103	2	1.69897	1.39794001

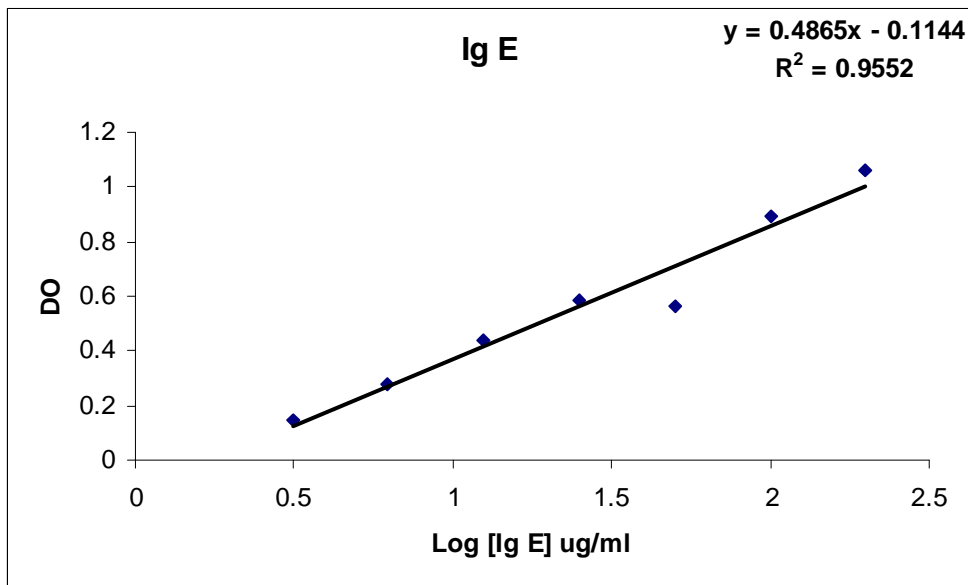


Figure 3. Courbe d'étalonnage de l'IgE. Les données affichées correspondent à la moyenne de trois réplifications.

DO	1.0623	0.8916	0.5613	0.582	0.4396	0.2776	0.1453
Log [Ig E]	2.30103	2	1.69897	1.39794001	1.09691001	0.79588002	0.49485002

IV.2.2.2. Dosage des IgA, IgE et IgG dans le sang périphérique

Procédure expérimentale

On procède à un « Coating », les puits de la plaque sont enduits par 100 µl du tampon carbonate bicarbonate et par 100 µl du sérum des souris dilué à 1/500 dans le tampon carbonate bicarbonate. On incube une nuit à 4 °C. Ensuite, on lave deux fois avec du PBS 1X-Tween 20 à 0.05 %. On sature la plaque avec de BSA à 1 %, cette opération dure 1 h 30 à 37 °C, après on rince deux fois avec du PBS 1X-Tween 20. On ajoute 50 µl des anti-Ig (A, E et G) couplé à la peroxydase et dilués dans le PBS 1X. L'incubation dure 1 h à 37 °C. On lave deux fois avec du PBS 1X-Tween 20 et on ajoute 50 µl de TMB qui est un substrat de la peroxydase. On couvre la plaque et on la met à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est arrêtée 15 minutes plus tard par l'ajout de 50 µl d'acide sulfurique 3 M. Les 96 puits des plaques ont été lus à 460 nm en utilisant un lecteur de microplaque (bio Tek, Winooski, VT, Etats-Unis). Les gammes de la courbe standard d'ELISA étaient (3.9-125 µg/ml; 12.5-200 µg/ml et 3.125-200 µg/ml) respectivement pour IgG, IgA et IgE. Les concentrations de ces immunoglobulines étaient en µg/ml.

Pour calculer la concentration d'un Ig, il suffit de faire la puissance, exemple :

Pour le IgG : PUISSANCE (10;(DO+0,0138)/0,5506)

Pour le IgA : PUISSANCE (10;(DO+0,1618)/0,2536)

Pour le IgE : PUISSANCE (10;(DO+0,1144)/0,4865)

V. Quantification du statut oxydatif cellulaire par l'évaluation du niveau des espèces réactives d'oxygènes à l'aide de la cytométrie en flux

V.1. Au niveau des leucocytes du sang périphérique

Les souris ont été anesthésiées avec l'halothane puis sacrifiées par décapitation 24 h après l'évaluation de leur niveau d'anxiété par le test comportemental CCO. Pour évaluer le

niveau des ERO dans les leucocytes, nous avons adopté la méthode de Bouayed et al. (2007b).

Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF) (Harrison et al., 2005). Si le taux des ERO augmente, l'intensité moyenne de fluorescence augmente.

V.2. Au niveau des neurones et des cellules gliales

Protocoles

Les souris ont été anesthésiées avec l'halothane puis sacrifiées par décapitation 24 h après le test de CCO. Le crâne a été ouvert et le cerveau a été enlevé sur glace. Après l'enlèvement des méninges de l'ensemble du cerveau, le cervelet, le cortex cérébral et l'hippocampe ont été recueillis sur glace dans des tubes séparés contenant du PBS 1X et de nouveau transférés dans des tubes séparés contenant du collagénase II 0.2 % (Invitrogen, France) pour la digestion à température ambiante pendant 30 minutes. Ensuite, le surnageant contenant la collagénase II a été complètement enlevé. 2 ml de la solution tampon (PBS 1X, EDTA 2 mM et 0.5 % BSA) ont été ajoutés. Une étape de filtration a été faite. Le filtrat a été centrifugé (4000 rpm, 10 min et à 4 °C). Le surnageant a été pipeté et 2 ml de la solution tampon ont été ajoutés. Ensuite, nous effectuons une centrifugation dans les mêmes conditions en éliminant le surnageant. Le culot a été suspendu dans 80 µl de solution tampon pour un total de 10^7 cellules et l'addition de 20 µl des billes anti-prominin-1 (Miltenyi Biotec, France) pour séparer les neurones et les cellules gliales des autres types des cellules dans le cerveau. Le mélange a été bien mixé et incubé durant 15 minutes à 4-8 °C. Les cellules ont été ensuite lavées avec 1-2 ml de tampon et centrifugées dans les mêmes conditions. Le surnageant a été complètement pipeté et les cellules sont de nouveau suspendues dans 500 µl de tampon. Nous avons procédé par la suite à la séparation magnétique par un séparateur approprié MINIMACS Column Separator (Miltenyi Biotec, France). Les cellules séparées ont

été ensuite centrifugées dans les mêmes conditions et le surnageant a été jeté. Le culot a été de nouveau suspendu dans 80 μ l de tampon, 10 μ l de l'anticorps CD90-PE et 10 μ l de l'anticorps CD11b-FITC (Miltenyi Biotec, France) et incubé pendant 10 minutes à 4-8 °C afin de séparer respectivement les neurones des cellules gliales. Ensuite, 1 ml de tampon a été ajouté et une centrifugation dans les mêmes conditions a été faite. Le surnageant a été jeté. Les cellules ont été suspendues dans 1 ml de tampon plus 5 μ l de DCFH-DA (50 μ M) et elles ont été mélangées et incubées pendant 15 minutes à 37 °C (Bouayed et al., 2007b). Le niveau des ERO intracellulaires de chaque souris a été mesuré en utilisant la technique de la cytométrie en flux. Les résultats sont exprimés en intensité moyenne de fluorescence (IMF) (Harrison et al., 2005). Si le taux des ERO augmente, l'intensité moyenne de fluorescence augmente.

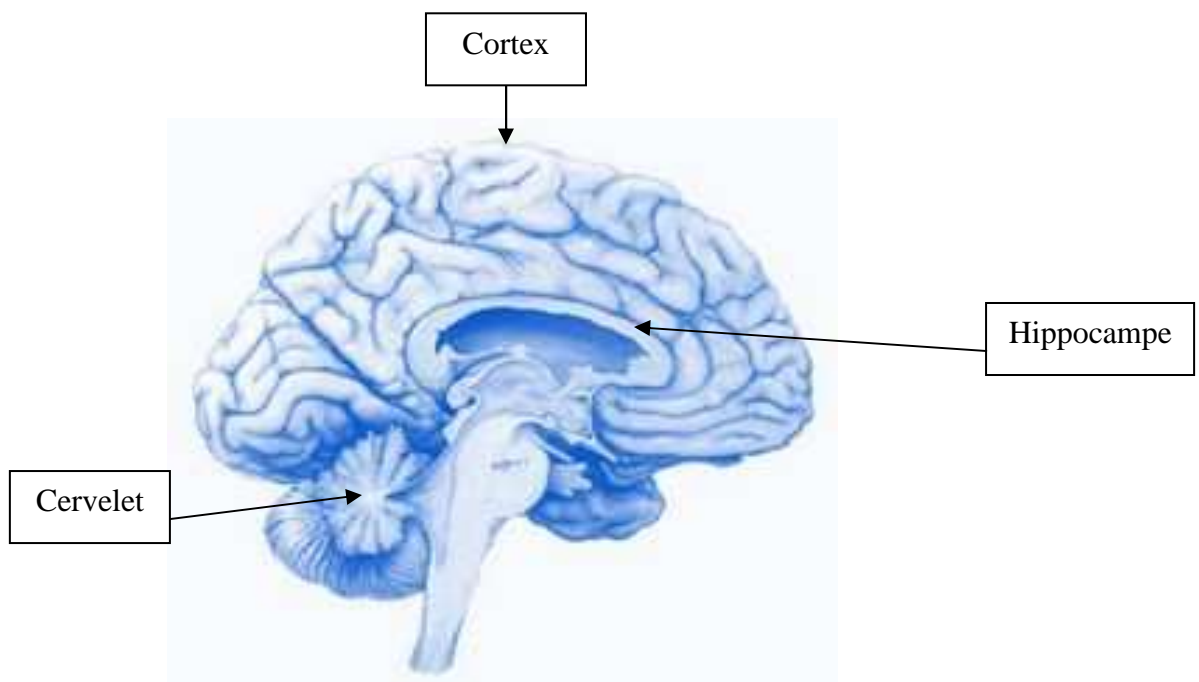


Photo 5. Les trois régions étudiées du cerveau

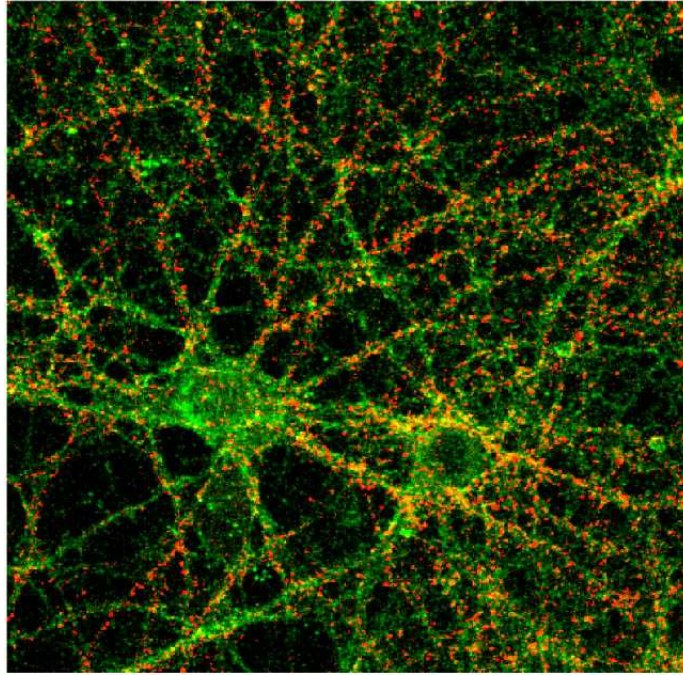


Photo 6. Neurones et leurs synapses (Karin Pierre, Institut de Physiologie, UNIL, Lausanne).

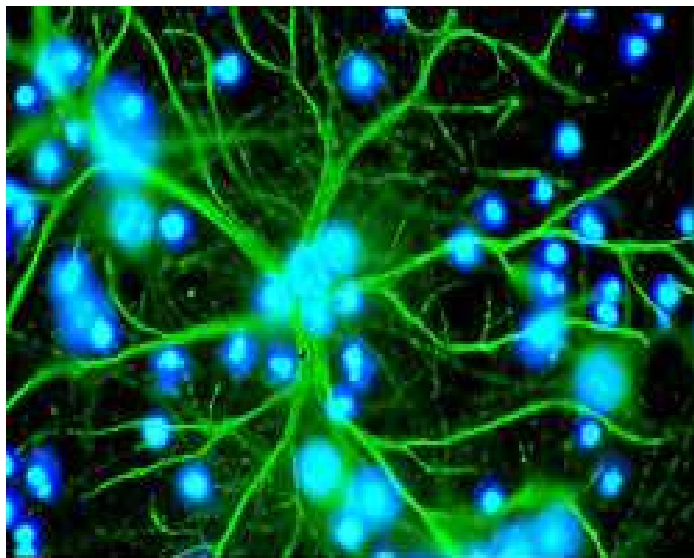


Photo 7. Cellules gliales étoilées (Karin Pierre, Institut de Physiologie, UNIL, Lausanne)

V.3. Principe

Le taux des espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaire des différentes catégories des cellules étudiées a été évalué en utilisant la sonde DCFH-DA (2',7'-diacétate

dichlorofluoresceine). La DCFH-DA est une molécule non polaire qui traverse les membranes cellulaires. La DCFH-DA est ensuite hydrolysée par les estérases cytosoliques en DCFH (dichlorofluoresceine), une molécule polaire non fluorescente (schéma 1). La DCFH est alors oxydée par les ERO intracellulaires en DCF (2',7'-dichlorofluoresceine), substance fortement fluorescente (Shen et al., 1996; Rota et al., 1999; Carini et al., 2000). La cytométrie en flux nous permet d'évaluer la fluorescence émise à 530 nm par les neurones et les cellules gliales suite à leur excitation par le faisceau laser à 488 nm et d'estimer la production des ERO (Goedken et al., 2004; Hong et al., 2004). Le cytomètre utilisé dans cette étude est un FACScan (Beckton Dickinson).

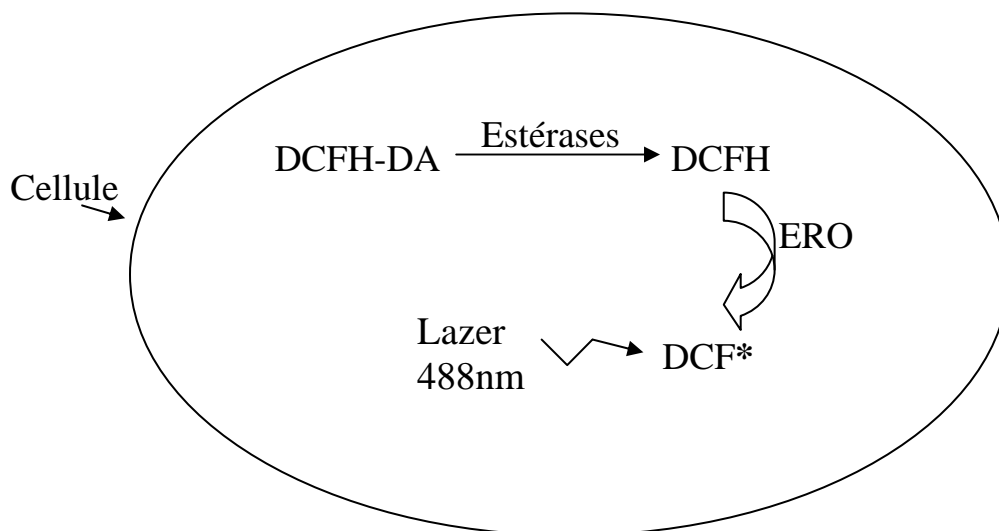


Figure 4. Représentation schématique des réactions intracellulaires conduisant à l'oxydation du DCFH en DCF composé émetteur de fluorescence. Le spectre d'émission de DCF, après son excitation par un faisceau laser à 488nm, est à 525nm détecté par le photomultiplicateur FL1 du cytomètre.

VI. Détermination de l'expression génique par RT-PCR

VI.1. Isolation de l'ARN, digestion de l'ADN et transcription inverse

Les ARN totaux ont été isolés dans des échantillons du cerveau de la souris Swiss. Ils ont été homogénéisés dans le Qiazol (Qiagen, Hilden, Allemagne), un réactif de lyse, selon le

protocol de fournisseur. Chaque échantillon a été traité avec la DNase 1 (Ambion, Applied bisystems, Darmstadt, Allemagne) pour éliminer la contamination de l'ADN génomique et testé par la suite pour la présence de l'ADN par la RT-PCR en temps réel. La concentration de l'ARN total a été déterminée par mesure photométrique à 260 nm. La transcription inverse a été réalisée en utilisant le kit de transcription inverse ADNc à haute capacité (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany).

VI.2. RT-PCR quantitative en temps réel SYBR green

Les séquences d'ADNc pour les récepteurs GABA_A, μ -opioïde (MOR-1), α -1 adrénergique, 5-HT_{1A} et 18S ont été obtenues à partir de la banque des gènes. Les produits PCR ont été quantifiés fluorimétriquement en utilisant le SYBR green.

La PCR en temps réel a été réalisée dans un iQ5 cyclor (Bio-Rad, Munich, Germany) en utilisant le kit PCR quantitative DyNAmo® Flash SYBR® Green (Finnzymes, Biocat, Heidelberg, Germany). Chaque échantillon a été mené en triplicata.

Les conditions d'amplification comprennent une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 7 minutes et une série de 40 à 45 cycles à 15 sec à 95°C, 15 sec à 60-64°C et 1 min à 60°C.

Les analyses de la courbe de fusion de 55°C-98°C ont été réalisées pour chaque échantillon et gène pour distinguer les produits spécifiques des non spécifiques. Le cycle seuil, qui représente le cycle PCR au cours duquel une augmentation de la fluorescence au-dessus de l'arrière-plan est détecté en premier, a été déterminé par le logiciel.

Gène	Numéros d'accèsion dans les banques des gènes
GABA _A	NM_010250
5-HT _{1A}	NM_008308
α ₁ adrénergique	NM_013460
μ -opioïde	NM_001039652
μ -18S	NR_003278

Gène	forward primer sequence	reverse primer sequence	amplicon size
GABA_A	5'GACTGCTGGACGGTT ATGACAA-3'	5'AATGTCGGTCTTCACTT CAGTTACAC-3'	73bp
5-HT_{1A}	5'TCGCTCACTTGGCTC ATTGGCTTT-3'	5'TTCCAACCTTCTTGACCG TCTTGCG-3'	240bp
α₁-adrénergique	5'CGCTGTGGTGGGAA CCGGCAG-3'	5'AGTTGGTGACCGTCTGC AAGT-3'	217bp
μ -opioïdes	5'GCCCTCTATTCTATC GTGTGTGTA-3'	5'GTTCCCATCAGGTAGTT AACACTC-3'	186bp
μ -18S	5'-GCG CTT CTC TTT CCG CCA-3'	5'AGCTCTCCGACACCTCT CTT-3'	149bp

VI.3. Analyses des données RT-PCR

La méthode de la quantification relative à l'aide du $\Delta\Delta C$ (t) a été utilisée pour déterminer le rapport entre l'échantillon (groupe anxieux) et le calibre (groupe non anxieux). Les niveaux de l'expression des gènes ont aussi été étalonnés par rapport au gène ARNr 18S pour chaque groupe pour tenir compte de la variabilité incontrôlée. L'analyse des données a été réalisée en utilisant le logiciel « Relative expression software tool (REST©) » (Pfaffel et al., 2002). Les données sont représentées dans des graphiques comme une moyenne \pm ES. Les différences dans les expressions entre le groupe contrôle et le groupe traité ont été évalués dans le groupe des moyens pour la signification statistique par ANOVA en utilisant des tests approximatifs de randomisation (Sigma Stat for Windows Software®, Version 2.0; Jandel Corporation) (Pfaffel et al., 2002). Une valeur de $P < 0.05$ a été considérée statistiquement significative.

VII. Analyses statistiques

Les données sont représentées par leur moyenne \pm ESM. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statview® 4.5 (Abacus Concepts, Inc.) et le

seuil de significativité a été fixé à $P < 0.05$. L'analyse statistique paramétrique a été réalisée par l'ANOVA suivi du test PLSD de Fisher lorsque le nombre de groupes comparés est supérieur à deux. Le test de Student a été utilisé pour comparer 2 groupes non-appariés. L'analyse statistique non paramétrique a été réalisée par le test Kruskal–Wallis suivi par le test Mann–Whitney U.

RÉSULTATS

RESULTATS

I. Choix du test comportemental et nature de l'anxiété

Après une série d'expérimentations préliminaires, nous avons utilisé deux tests comportementaux les plus connus et les plus utilisés pour les études de l'anxiété, le test du labyrinthe en croix surélevé et le test de la CCO (photo 1). Lors des analyses des données obtenues avec les deux tests et leur comparaison nous avons constaté que le test CCO durant 3 minutes a permis une meilleure séparation des souris selon leur niveau d'anxiété.

D'une manière globale et sur toute la période de l'expérimentation (15 jours), nous avons constaté que 90 % de la population totale des souris anxieuses ont gardé le même statut d'anxiété et sont restées anxieuses. De la même manière, chez les souris non-anxieuses, il n'y avait pas eu de changement de statut d'anxiété jusqu'à la fin de l'étude.

Ces résultats ont été reproduits sur plusieurs périodes différentes et par des expérimentateurs différents. Ils nous ont permis ainsi de constater que l'état d'anxiété d'un grand nombre de souris est resté stable au même niveau après deux semaines d'adaptation et d'observation.

Nous pourrions donc qualifier cette anxiété de « trait » ou endogène étant donné que les conditions environnementales ne l'ont ni affecté ni modifié et qu'elle est restée stable.

II. Etudes immunitaires

II.1. Effet du niveau de l'anxiété sur les cellules périphériques du sang (leucocytes) (immunité cellulaire)

Les analyses des résultats obtenus ont montré que le niveau d'anxiété élevé entraîne une diminution significative du nombre des lymphocytes totaux ($P < 0.02$), des $TCD4^+$ ($P < 0.0025$) et des $TCD8^+$ ($P < 0.05$). En même temps, ce niveau d'anxiété élevé a montré une tendance à l'augmentation de la proportion des granulocytes, des monocytes et des cellules

NK mais d'une manière non significative (Tableau 4). Cela est en faveur d'une altération de l'immunité cellulaire (immunosuppression).

	Non-anxieuses	Anxieuses
Lymphocytes totaux	6583 ± 214	5352 ± 332 *
TCD4⁺	3943 ± 114	2940 ± 223 **
TCD8⁺	865 ± 65	634 ± 63 *
NK	315 ± 43	478 ± 115
Granulocytes	1241 ± 160	1398 ± 221
Monocytes	117 ± 16	151 ± 29

Tableau 4. Effet de l'anxiété sur le nombre des granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et cellules NK chez les souris (n=10). Les données sont représentées en moyenne ± ESM. *P<0.05; **P<0.01. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Mann-Whitney.

II.2. Effets de l'anxiété sur l'immunité humorale par l'évaluation des immunoglobulines

(A, E et G) dans le sang

Les analyses des résultats ont montré que le niveau d'anxiété élevé entraîne une diminution significative de la concentration des IgA et IgE (P<0.05) (Tableau 5). Par contre, il a été observé au niveau des IgG une baisse non significative induite par le niveau élevé de l'anxiété (P>0.05) (Tableau 5). Ces résultats montrent que le niveau élevé de l'anxiété induit une altération de l'immunité humorale avec une confirmation d'une immunosuppression.

	Non-anxieuses	Anxieuses
IgA	25.13 ± 2.6	15.61 ± 1.7 **
IgE	12.62 ± 2.9	5.6 ± 1.3 **
IgG	2.71 ± 0.23	2.21 ± 0.13

Tableau 5. Effet de l'anxiété sur les concentrations des immunoglobulines (A, E et G) chez les souris (n=10). Les données sont représentées en moyenne ± ESM. **P<0.01. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Student et le test de Mann-Whitney.

II.3. Effets du stress expérimental par contention sur le niveau d'anxiété

Au bout de 15 jours d'application du stress expérimental par contention sur les souris anxieuses et non-anxieuses nous avons relevé que :

Chez les souris anxieuses

- * 80 % ont gardé leur statut initial
- * 20 % sont devenues intermédiaires

Chez les souris non-anxieuses

- * 25 % ont gardé leur statut initial
- * 75 % sont devenues anxieuses

À la lumière de tous ces résultats, nous pouvons constater que le modèle de stress utilisé dans notre travail de recherche présente un caractère anxiogène.

II.3.1. Effets de l'anxiété couplée au stress aigu par contention sur l'immunité cellulaire (leucocytes)

Le traitement des données a révélé que le stress expérimental par contention a induit, à la fois chez les souris anxieuses et les souris non anxieuses, une diminution significative du nombre des lymphocytes totaux, des TCD4⁺ et des TCD8⁺ (P<0.05), et une augmentation significative du nombre des granulocytes (P<0.05) (Tableau 6). En même temps, ce modèle

de stress a entraîné une baisse du nombre des monocytes et des cellules NK mais d'une manière non significative ($P>0.05$) à la fois chez les souris anxieuses et les non anxieuses (Tableau 6). Donc le stress expérimental par contention a accru le niveau de l'anxiété des différentes populations.

Jour 1 (2h)				
	Non-anxieuses	Non-anxieuses Stressées	Anxieuses	Anxieuses Stressées
Lymphocytes totaux	6695 ± 175	4292 ± 343 ***	5668 ± 311	3243 ± 301 **
TCD4 ⁺	3963 ± 120	2595 ± 210 ***	3069 ± 184	1978 ± 166 **
TCD8 ⁺	876 ± 63	605 ± 63 **	710 ± 81	442 ± 51 *
NK	316 ± 42	217 ± 30	431 ± 114	346 ± 102
Granulocytes	1230 ± 153	2589 ± 271 **	1418 ± 214	3236 ± 357 **
Monocytes	117 ± 17	107 ± 11	150 ± 29	113 ± 18

Tableau 6. Effet de l'anxiété couplée au stress aigu par contention sur le nombre des granulocytes, monocytes lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et NK chez les souris (n=10). Les données sont représentées en moyenne \pm ESM. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; * $P<0.001$. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Mann-Whitney.**

II.3.2. Effets de l'anxiété couplée au stress subaigu par contention sur les leucocytes

Les analyses statistiques des données ont révélé que, à la fois chez les anxieuses et les souris non anxieuses, le stress expérimental par contention appliqué en subaigu a entraîné d'une part, une diminution significative du nombre des lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ ($P<0.05$), et d'autre part, une augmentation significative du nombre des granulocytes et des monocytes ($P<0.05$) (Tableau 7). D'une manière non significative, le nombre des cellules NK a augmenté par le stress expérimental par contention chez les souris non anxieuses

contrairement aux souris anxieuses dont une diminution significative a été constatée (Tableau 7). Cela montre que le stress expérimental appliqué sur des individus anxieux entraîne une aberration des altérations déjà constatées par le niveau élevé de l'anxiété.

Jour 15 (J15)				
	Non anxieuses	Non anxieuses	Anxieuses	Anxieuses
		Stressées		Stressées
Lymphocytes totaux	5557 ± 226	4278 ± 413 *	5412 ± 301	2711 ± 704 **
TCD4⁺	3173 ± 174	2231 ± 319 *	2703 ± 123	1614 ± 474 *
TCD8⁺	841 ± 36	723 ± 210 *	762 ± 55	401 ± 84 **
NK	475 ± 66	594 ± 154	636 ± 105	312 ± 69 *
Granulocytes	835 ± 90	1927 ± 498 *	1063 ± 200	3977 ± 855 **
Monocytes	108 ± 18	146 ± 22 *	83 ± 14	201 ± 74 *

Tableau 7. Effet de l'anxiété couplée au stress subaigu par contention sur le nombre des granulocytes, monocytes lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et cellules NK chez les souris (n=10). Les données sont représentées en moyenne ± ESM. *P<0.05; **P<0.01. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Mann-Whitney.

II.4. Effets de l'anxiété couplée au stress aigu par contention sur les immunoglobulines (immunité humorale)

Les résultats obtenus après analyse statistique des données ont montré que 2h d'application de stress aigu par contention ont induit une diminution significative de la concentration des IgA à la fois chez les souris anxieuses (P=0.0026) et chez les souris non anxieuses (P<0.0016). Nous avons également constaté une diminution significative de la concentration des IgE chez les souris anxieuses (P=0.0078) comme chez les souris non anxieuses (P=0.0008) (Tableau 8). Les résultats ont montré aussi que 2h de stress par

contention ont diminué significativement la concentration des IgG chez les souris non anxieuses ($P=0.04$) sans l'affecter chez les souris anxieuses ($P>0.05$) (Tableau 8).

Jour 1 (2h)				
	Non-anxieuses	Non-anxieuses Stressées	Anxieuses	Anxieuses Stressées
IgA	37.5 ± 3.25	17.77 ± 1.61 **	29.71 ± 2.56	15.88 ± 1.88 ##
IgE	12.76 ± 1.92	5.24 ± 0.62 **	8.44 ± 1.35	4.11 ± 0.68 ##
IgG	4.34 ± 0.43	3.07 ± 0.37 *	3.64 ± 0.37	3.53 ± 0.43

Tableau 8. Effets du stress par contention sur les immunoglobulines chez les souris anxieuses et les non-anxieuses. * $P<0.05$; ** $P<0.01$; * $P<0.001$; ## $P<0.01$. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=10). Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Mann Whitney et le test de Student.**

II.5. Effets de l'anxiété couplée au stress subaigu par contention sur les immunoglobulines

Les résultats obtenus montrent que l'application du stress expérimental par contention pendant 2h/jour sur une période de 15 jours induit une diminution significative de la concentration des différentes immunoglobulines étudiées (A, E et G) à la fois chez les souris anxieuses ($P=0.0008$, $P=0.0008$ et $P=0.0046$ respectivement) et chez les souris non anxieuses ($P=0.0005$, $P=0.0005$ et $P=0.0005$ respectivement) (Tableau 9).

Jour 15 (J15)				
	Non-anxious	Non-anxious stressed	Anxious	Anxious stressed
IgA	36 ± 3.2	16 ± 0.7 ***	33 ± 2	13.5 ± 0.73 ###
IgE	14 ± 1.5	4.5 ± 0.42 ***	12 ± 2	3.5 ± 0.2 ###
IgG	5.83 ± 0.6	2.6 ± 0.2 ***	4.3 ± 0.34	3 ± 0.25 ##

Tableau 9. Effets du stress expérimental par contention sur les immunoglobulines chez les souris anxieuses et les non anxieuses. *P<0.001; ##P<0.01; ###P<0.001. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=10). Les analyses statistiques sont réalisées par le test de Student.**

III. Evaluation de l'impact de l'anxiété sur le statut oxydatif des cellules périphériques (leucocytes)

Le niveau d'anxiété d'un lot de souris mâles Swiss naïves a été initialement évalué dans le test de la chambre claire/obscur sur la base des paramètres comportementaux étudiés (voir Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus ont montré des différences significatives dans le statut redox intracellulaire des granulocytes, des lymphocytes et des monocytes chez les souris anxieuses. Le statut oxydatif de chaque souris a été quantifié par le suivi de l'intensité moyenne de fluorescence émise résultante de l'oxydation de dichlorofluoresceine (DCFH) intracellulaire par les ERO. Les résultats obtenus après analyse statistique ont révélé que le niveau de l'anxiété est corrélé aux niveaux des ERO dans les granulocytes (P=0.0045), les lymphocytes totaux (P=0.026) et les monocytes (P=0.029) (Tableau 10).

Groupes	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes
Non-anxieuses	135 ± 12	418 ± 87	25 ± 4
Anxieuses	215 ± 31 *	1635 ± 375 **	46 ± 8 *

Tableau 10. Effets de l'anxiété sur le statut oxydatif des lymphocytes, des granulocytes et des monocytes du sang périphérique. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=10). *p<0.05, **p<0.05. Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Student.

IV. Evaluation de l'impact de l'anxiété sur le statut oxydatif des cellules centrales (neurones et cellules gliales) et périphériques (lymphocytes, granulocytes et monocytes)

Le niveau d'anxiété d'un lot de souris mâles Swiss naïves a été initialement évalué dans le test de la chambre claire/obscur sur la base des paramètres comportementaux étudiés (voir Matériels et Méthodes). Les résultats obtenus montrent qu'il existe des différences significatives au niveau du statut redox intracellulaire aussi bien dans les cellules centrales (neurones et cellules gliales) que périphériques (granulocytes, lymphocytes et monocytes) chez les mêmes souris étudiées. Pour chaque animal, le statut oxydatif de ces cellules a été quantifié par le suivi de l'intensité de fluorescence émise résultante de l'oxydation de DCFH intracellulaire par les ERO. Les résultats obtenus et les analyses statistiques ont révélé d'une part, que le niveau élevé de l'anxiété induit une augmentation de manière significative du taux des ERO au niveau des neurones dans le cortex cérébral (P=0.0052), le cervelet (P=0.03) et l'hippocampe (P=0.03) (Tableau 11). En même temps, ce niveau élevé de l'anxiété a entraîné une augmentation de façon significative du taux des ERO au niveau des cellules gliales dans le cervelet et l'hippocampe (P=0.017 et P=0.02 respectivement) contrairement au cortex cérébral où l'augmentation n'a pas été significative (P>0.05) (Tableau 11). D'autre part et de manière corrélée, une différence significative entre les souris anxieuses et les souris non-

anxieuses a été relevée au niveau de l'accumulation intracellulaire des ERO dans les cellules périphériques (granulocytes, lymphocytes et monocytes) (P=0.005, P=0.046 et P=0.04 respectivement) (Tableau 11).

Type de cellules	Intensité moyenne de fluorescence (unité arbitraire)	
	Souris anxieuses	Souris non-anxieuses
Neurones du cortex cérébral	1223 ± 232 **	177±76
Neurones du cervelet	546 ± 128 *	227 ± 41
Neurones de l'hippocampe	1749 ± 566 *	227 ± 51
Cellules gliales du cortex cérébral	429 ± 48	310 ± 72
Cellules gliales du cervelet	343 ± 36 *	195 ± 31
Cellules gliales de l'hippocampe	468 ± 43 *	319 ± 29
Lymphocytes	251 ± 46 *	152 ± 11
Monocytes	56 ± 9 *	35 ± 2.5
Granulocytes	1979 ± 405 **	448 ± 77

Tableau 11. Accumulation des ERO intracellulaires dans les cellules centrales et périphériques des souris anxieuses et non-anxieuses. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM. (n=10). *P<0.05, **P<0.01. Les analyses statistiques ont été réalisées par le test de Student.

V. Détermination de l'expression génique par RT-PCR

Les données ont été analysées pour des différences significatives par ANOVA en utilisant des tests approximatifs de randomisation (Sigma Stat logiciels pour Windows ®, version 2.0; Jandel Corporation) (Pfaffel et al., 2002).

Nous avons considéré dans le cadre de l'analyse statistique des résultats que le niveau de base de l'expression des gènes codants des différents récepteurs étudiés était relatif au

groupe des animaux « non anxieux » qui ont constitué le niveau de base. La comparaison des expressions de ces gènes des animaux anxieux par rapport aux non anxieux a permis de relever que les résultats obtenus par la technique de la RT-PCR en temps réel montrent que les gènes codants relatifs aux récepteurs α_1 -adrénergiques et sérotoninergiques 5-HT_{1A} sont surexprimés significativement chez les souris anxieuses. Par contre, les gènes codants des récepteurs μ -opioïdes qui sont impliqués dans la réponse au stress et à la douleur, et des récepteurs GABA_A principalement impliqués dans les phénomènes d'inhibition sont significativement sous-exprimés chez les souris anxieuses.

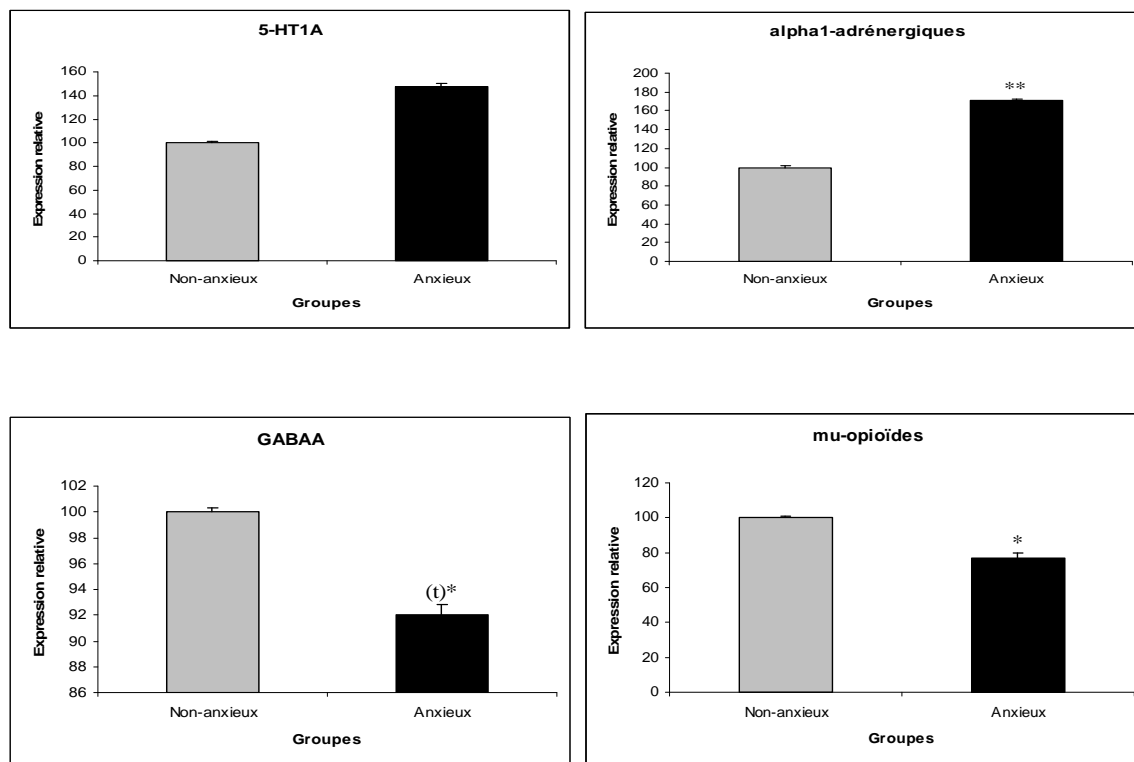


Figure 5. Effet de niveau élevé de l'anxiété sur l'expression des gènes codants pour les récepteurs GABA_A, 5-HT_{1A}, α_1 -adrénergiques et μ -opioïdes. Les données sont exprimées en moyenne \pm ES. (n=10). (t) : tendance.

Comme le montrent les graphes et en prenant le niveau de bases des lots d'individus non-anxieux, le niveau d'expression des 5-HT_{1A}-mRNA est plus élevé chez les individus de niveau d'anxiété élevé en comparaison au lot dit non-anxieux.

Pour les gènes des récepteurs α_1 -adrénergiques-mRNA, nous pouvons constater également un niveau d'expression plus élevé significativement ($P < 0.01$) chez les animaux anxieux par rapport aux animaux non-anxieux.

Au niveau des gènes des récepteurs GABA_A-mRNA et μ -opioïdes-mRNA, nous relevons une sous-expression significative ($P < 0.05$) de ces sous-types de récepteurs chez les individus de niveau d'anxiété élevé.

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les hypothèses qui ont guidé notre travail de recherche ont particulièrement porté sur la mise en évidence expérimentale d'un éventuel lien entre l'anxiété, le stress et les troubles de certaines fonctions organiques ou cellulaires choisies pour cette étude. En effet, s'il est admis généralement que les conditions de l'environnement (stress physique, chimique, psychique,...) peuvent induire ou aggraver de nombreux troubles organiques et fonctionnels, il n'existe que très peu de travaux ou des travaux au stade hypothétique suggérant la validation expérimentale de ces liens et surtout les mécanismes cellulaires ou moléculaires sous-jacents. Tels étaient la mission et l'objectif de ce travail de notre équipe dont une partie a été réalisée au cours de cette thèse.

Ainsi, les résultats obtenus ont permis de relever plusieurs conclusions et de soulever plusieurs questions. Sur le plan méthodologique, nous avons ainsi mis en évidence à travers ces travaux le caractère sélectif du tri comportemental qui a permis à l'aide d'un test spécifique à l'étude de l'anxiété, le test de la chambre claire/obscur (CCO), d'identifier deux groupes d'individus selon leur niveau d'anxiété.

Ainsi, dans le test de la CCO décrit par Crawley and Goodwin, (1980), l'anxiété est générée par le conflit entre les désirs d'explorer et de se retirer d'un espace inconnu et bien éclairé (Blumstein and Crawley, 1983; Misslin et al., 1989; Belzung and Le Pape, 1994; Smythe et al., 1996). Dans notre travail de recherche, les paramètres évalués dans ce test ont été : le temps de latence qui correspond au temps passé par la souris dans le compartiment obscur avant sa première sortie dans le compartiment clair, le nombre de sorties (transitions) du compartiment obscur vers le compartiment clair et le temps passé dans le compartiment clair. Ces variables ont été utilisées par d'autres chercheurs pour démontrer l'activité anxiolytique (Belzung et al., 1987; Jones et al., 1988; Costall et al., 1989; Young and Johnson, 1991; Lepicard et al., 2000; Dailly et al., 2002; Graeff and Zangrossi, 2002;

Bouayed et al., 2007a,b; Rammal et al., 2008a,b). Nous avons de notre côté exploré la possibilité d'utiliser ces différentes variables de manière à en dégager un indice arbitraire mais qui nous fournit un outil quantitatif pour mesurer l'anxiété à partir de l'observation des paramètres choisis.

Au sein de notre équipe, Bouayed et al. (2007b) ont rapporté que les souris SWISS montrent une large hétérogénéité dans leurs niveaux d'anxiété. Dans notre travail de recherche, pour éviter des résultats biaisés et en se basant sur des études réalisées par d'autres équipes (Krömer et al., 2005; Vautrin et al., 2005; Ditzen et al., 2006), nous avons utilisé des souris ayant des niveaux d'anxiété opposés (anxieuses et non-anxieuses) pour avoir une bonne vision comparative de l'impact de l'anxiété sur les différentes fonctions étudiées dans cette étude.

Nous avons considéré que l'anxiété évaluée chez les souris utilisées dans ce travail de recherche est une anxiété « trait » pour deux raisons. D'une part, le niveau d'anxiété a été stable dans le temps, parce que nous avons trouvé en utilisant le test de la CCO que les souris anxieuses et les non-anxieuses n'ont pas changé leur niveau d'anxiété pendant une période de plus de 15 jours. D'autre part, dans cette même étude, nous avons trouvé que ces souris, en conservant leur statut d'anxiété, présentent le même profil immunitaire trouvé au début.

En ce qui concerne le caractère anxiogène du modèle de stress par contention que nous avons choisi pour les études, nous avons pu mettre en évidence ce caractère anxiogène afin de mieux spécifier la nature du stress expérimental auquel ont été exposés les animaux. Les différents résultats obtenus ont montré qu'une durée de 2h de stress expérimental par contention, appliquée quotidiennement sur une période de 15 jours, a augmenté significativement le niveau d'anxiété chez la souris, lorsque le nombre de transition entre les deux compartiments et le temps passé dans le compartiment éclairé ont diminué, en même temps le temps de latence a augmenté. Ces présents résultats sont en accord avec d'autres

obtenus par d'autres équipes qui ont signalé que le stress expérimental par contention avait un caractère anxiogène (Jones et al., 1988; Costall et al., 1989; Cancela et al., 1995; Padovan and Guimarães, 2000; Dailly et al., 2002; Bowman et al., 2004).

Dans le cadre de nos hypothèses, nous avons tenté de vérifier expérimentalement le lien existant entre l'anxiété, le stress anxiogène et les troubles immunitaires. Nos résultats ont montré que le niveau élevé d'anxiété a inhibé une partie de l'immunité cellulaire et humorale par l'abaissement du niveau des lymphocytes totaux y compris les lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺, et les concentrations des immunoglobulines (A, E et G). Il n'a pas été relevé de changement significatif de l'immunité cellulaire concernant le niveau des granulocytes, des monocytes et des cellules NK. L'ensemble de ces résultats a montré un effet dépressif de l'anxiété sur l'immunité cellulaire et humorale des souris anxieuses.

De la même manière, nos résultats ont aussi démontré que le stress expérimental par contention a activé une partie de l'immunité cellulaire en augmentant les niveaux des granulocytes et des monocytes à la fois chez les souris anxieuses et non-anxieuses indiquant une perturbation de la réponse non-spécifique de leurs défenses immunitaires. Toutefois, ce stress expérimental par contention a inhibé l'autre partie de l'immunité cellulaire en diminuant le taux des cellules NK et des lymphocytes totaux y compris les lymphocytes TCD4⁺ et TCD8⁺, ce qui confirme le caractère anxiogène immunodépressif de ce modèle de stress. De plus, le stress expérimental par contention (aigu et subaigu) a mené à une diminution significative de la concentration d'immunoglobulines (A, E et G), inhibant l'immunité humorale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Bowers et al. (2008) qui ont suggéré que 2h de stress expérimental par contention ont induit une diminution du nombre des lymphocytes totaux y compris les cellules T et B contrairement aux autres qui ont observé une redistribution des leucocytes du sang vers les organes tels les ganglions lymphatiques et la peau (Dhabhar et al., 1994; Dhabhar et al., 1995; Dhabhar, 1996, 1997; Dhabhar and

McEwen, 1996). Les résultats de notre travail ont révélé également que le stress expérimental par contention a aggravé les effets générés par l'anxiété élevée sur l'immunité cellulaire et humorale; par conséquent, il a contribué à la diminution de l'efficacité du système immunitaire des souris.

D'une manière reproductible, le stress anxiogène aigu par contention a généralement montré un effet immunosuppresseur comme celui du stress subaigu. Ces présents résultats sont en accord avec d'autres études qui ont montré que quelques aspects du système immunitaire sont augmentés et d'autres sont diminués par le stress chronique par contention (Cunnick et al., 1988; van Raaij et al., 1996; Mizoguchi et al., 2001; Nakano, 2004). En outre, cette étude nous permet d'émettre l'hypothèse que l'effet immunodépressif du stress expérimental par contention pourrait être dû à son caractère anxiogène, puisque le niveau élevé d'anxiété s'est avéré immunodépressif.

Dans une étape suivante, nous nous sommes interrogés sur les mécanismes cellulaires et moléculaires qui seraient à l'origine de ces troubles engendrés par l'anxiété. Ainsi, l'un des mécanismes qui nous a interpellés est celui qui se rapporte à l'état oxydatif cellulaire lié à la production des ERO et des radicaux libres. En effet, lors de ce travail de recherche, les résultats obtenus ont montré que l'anxiété qui est impliquée dans un certain nombre de troubles psychiatriques tels que l'anxiété généralisée, la dépression, les crises de panique, les phobies, le trouble obsessionnel compulsif et les troubles de stress post-traumatique (Gross and Hen, 2004), est corrélée à un stress oxydatif mis en évidence par une accumulation des ERO au niveau des cellules périphériques (lymphocytes, granulocytes et monocytes) et des cellules centrales (neurones et cellules gliales) chez la souris. En effet, le stress oxydatif peut être défini comme un déséquilibre entre la formation des ERO et le système antioxydant endogène de défense cellulaire en faveur du premier (Halliwell and Gutteridge, 1999). Plusieurs voies produisent les intermédiaires réactives de l'oxygène *in vivo* et dont la chaîne

mitochondriale respiratoire est la principale source (Delattre et al., 2005). Ainsi, lorsque leur production l'emporte sur les systèmes de défense cellulaire endogènes, de nombreux endommagements peuvent en découler tels que l'atteinte des acides nucléiques, des protéines, les lipides, et d'autres composants cellulaires (Cadenas, 1989). Nos résultats sont en accord avec d'autres études montrant que les situations stressantes ont été associées à la production excessive des métabolites toxiques de l'oxygène. Dans ce contexte, il a été démontré que le stress chronique par contention, un stress physique et psychologique qui a aussi un caractère anxiogène (Jones et al., 1988; Costall et al., 1989), induit un stress oxydatif (Madrigal et al., 2001; Sood et al., 2006). De plus, il a été souligné que le stress oxydatif est lié à certains comportements comme la dépression, l'anxiété pathologique et les niveaux d'anxiété. En effet, plusieurs auteurs ont signalé que la production massive des radicaux libres de l'oxygène est associée à des troubles neurologiques et psychiatriques tels que la dépression (Bilici et al., 2001; Michel et al., 2007S; zuster-Ciesielska et al., 2008). Il a été également suggéré que les radicaux libres peuvent jouer un rôle dans la pathogenèse des troubles de l'anxiété, étant donné que les érythrocytes des patients ayant des troubles obsessionnels compulsifs et des troubles de panique, peuvent avoir des niveaux plus élevés des enzymes antioxydants tels que la glutathion peroxydase et la superoxide dismutase (Kuloglu et al., 2002a,b).

Ainsi, au vu de l'ensemble des résultats, nous avons pu dégager certaines remarques et observations,

Au niveau des effets sur les fonctions centrales, comme le cerveau est particulièrement vulnérable au stress oxydatif pour plusieurs raisons, parmi lesquelles sa forte consommation de l'O₂, ses modestes capacités de défenses antioxydantes et sa composition riche en lipides (Haliwell, 2006a; Ng et al., 2008), il apparaît évident que le stress oxydatif soit impliqué dans de nombreuses maladies, y compris le cancer, les maladies neurodégénératives et plusieurs pathologies psychiatriques (Ng et al., 2008; Valko et al.,

2007; Haliwell, 2006a; Kuloglu et al., 2002a,b). Le lien entre le stress oxydatif et l'anxiété a donc fait l'objet de plusieurs travaux et récemment, notre équipe a mis en évidence une corrélation linéaire entre les marqueurs du stress oxydatif au niveau périphérique et l'anxiété chez les souris (Bouayed et al., 2007b) qui ont été renforcés par nos présents travaux sur cette même relation corrélative entre l'anxiété et le stress oxydant au niveau des cellules périphériques comme centrales. Ces résultats confirment des études qui ont montré une relation étroite entre les marqueurs du stress oxydatif dans le cerveau et les phénotypes reliés à l'anxiété dans six souches des souris (Hovatta et al., 2005). La relation entre les extrêmes de l'anxiété et le statut oxydatif central est plus complexe, étant donné que le glyoxalase 1 est exprimé à un niveau élevé chez les souris non-anxieuses comparées aux souris anxieuses (Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). Cette évidence opposée peut être reliée à la différence des modèles d'animaux utilisés (Thornalley, 2006). Dans notre travail de recherche, nous avons comparé le statut oxydatif central et périphérique de la même souche des souris ayant des niveaux d'anxiété opposés différemment des études antérieures (Hovatta et al., 2005; Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). Les souris de cette souche ont été sélectionnées de manière stricte du fait que seulement 10 % ont été considérées anxieuses et 10 % non-anxieuses sur la population générale étudiée. Nous avons utilisé une seule souche de souris afin d'éviter des biais dans les résultats.

Par ailleurs, en utilisant la DCFH-DA, un traceur des ERO (Carini et al., 2000; Rota et al., 1999; Shen et al., 1996; Bouayed et al., 2007b), nous avons évalué de manière comparative l'accumulation intracellulaire des ERO au niveau central dans les neurones et les cellules gliales prélevés au niveau de trois régions différentes du cerveau (cortex cérébral, cervelet et hippocampe) et au niveau périphérique dans les cellules leucocytaires (granulocytes, lymphocytes et monocytes) des mêmes souris présentant un niveau d'anxiété opposé. Le niveau des ERO peut être évalué directement par une sonde comme la DCFH-DA

(Carini et al., 2000; Rota et al., 1999) ou indirectement en mesurant le niveau de certains enzymes antioxydants, en produisant de la peroxydation lipidique ou par le niveau de zinc, fer et cuivre (Kuloglu et al., 2002a,b). Nos résultats ont montré qu'il existe une forte corrélation des cellules étudiées entre une forte accumulation des ERO intracellulaires et le niveau élevé de l'anxiété suggérant ainsi que le stress oxydatif est d'un niveau élevé dans les structures cérébrales et périphériques des souris anxieuses. Des différences significatives ont été trouvées entre les souris anxieuses et les souris non-anxieuses par rapport à leur statut oxydatif à la fois dans les neurones et dans les cellules gliales de deux régions du cerveau (cervelet et hippocampe), dans les neurones du cortex cérébral et dans les cellules périphériques (granulocytes, lymphocytes et monocytes). Nous avons ainsi mis en évidence que le stress oxydatif dans l'hippocampe des souris anxieuses a été plus prononcé dans les neurones que dans les cellules gliales, comme l'intensité moyenne de fluorescence résultant de l'oxydation intracellulaire de DCFH-DA par les ERO intracellulaires dans les neurones a été approximativement quatre fois plus élevée que dans les cellules gliales. De plus, le stress oxydatif dans le cortex cérébral des souris anxieuses a été relevé seulement dans les neurones. Ces observations peuvent être expliquées par le fait que les cellules gliales possèdent un système de défense antioxydant plus fort que celui des neurones en raisons des concentrations élevées en enzymes antioxydants présents et une faible composition en lipides poly-insaturés (O'Brien and Sampson, 1965; Raps et al., 1989). Les cellules gliales jouent un rôle important dans la protection du système nerveux en détoxifiant les ERO libérées par les neurones et en agissant comme éboueurs des débris et tueurs des agents pathogènes microbiens (Mosly et al., 2006; Morale et al., 2006). La perturbation de l'équilibre du statut oxydatif par un excès de production des ERO dans les cellules gliales du cervelet et de l'hippocampe des souris anxieuses peut donc altérer leurs fonctions protectrices. Il est largement admis que le stress oxydatif soit impliqué comme l'une des principales causes des dommages neuronaux dans un

large éventail des maladies neurologiques, et que la signalisation entre les neurones et les cellules gliales durant les dommages neuronaux incite les réponses inflammatoires (Morale et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le niveau élevé de l'anxiété de manière répétitive peut entraîner une rupture de l'équilibre oxydatif provoquant des phénomènes de neuroinflammation et de neurodégénération.

Lors de ces travaux, nous avons également relevé l'importance de l'expression des gènes codants des récepteurs choisis pour ces études (GABA_A , 5-HT_{1A} , μ -opioïdes et α_1 -adrénergiques). Cela est en faveur avec le constat que nous avons déjà suggéré et selon lequel, l'anxiété étudiée est une anxiété « Trait » liée à des facteurs endogènes dont l'expression également des récepteurs neuromembranaires.

En effet, nous pourrions dégager plusieurs observations sur les résultats relatifs à l'expression des gènes codants des récepteurs étudiés.

En ce qui concerne les récepteurs GABA_A , nous savons que ces récepteurs sont particulièrement impliqués dans des phénomènes d'inhibition. Ces phénomènes dépendent de l'activation ou de l'inhibition des récepteurs et sont susceptibles de se traduire par des entrées massives de l'ion chlore (Cl^-) et d'une hyperpolarisation membranaire lors d'une activation ou d'une diminution avec une limitation d'entrée de ces ions lors d'une désactivation. Cela correspond en conditions normales à une modulation par inhibition synaptique renforçant les actes inhibiteurs et réduisant les actes excitateurs. Ainsi, le comportement anxieux d'un individu est soumis à cette modulation endogène pour permettre le maintien d'un état d'équilibre anxio-comportemental. En effet, lors de l'expression normale d'une anxiété l'individu animal peut manifester deux situations comportementales observables, soit une hyperagitation probablement liée à une diminution de l'action inhibitrice des récepteurs GABA (acte désinhibiteur), soit une diminution comportementale liée à un accroissement de l'action inhibitrice du GABA . Ainsi les comportements liés à l'anxiété et modulés par le

GABA sont tantôt hyperactivés tantôt hypoactivés en fonction des éléments endogènes et exogènes et ceci dans un interval de fluctuation ponctuelle et passagère. Cela assure un état d'équilibre. Lorsque ce système modulateur est atteint de manière continue, il peut apparaître une rupture de cet équilibre avec la manifestation d'une hyper-anxiété ou aussi d'une hypo-anxiété pathologique. Nous supposons que les gènes codants de ces récepteurs ont une expression de base donnant lieu à ce que de nombreux auteurs appellent l'anxiété « TRAIT ». Chez les deux groupes d'animaux que nous avons triés selon leur niveau d'anxiété « trait », nous pourrions supposer que le niveau élevé de l'anxiété soit lié à l'expression des gènes codants sans lien avec l'environnement externe puisque nous avons ainsi mis en évidence la stabilité de cette anxiété. Si le niveau élevé de l'anxiété est corrélé à la sous-expression des récepteurs GABA_A, cela veut signifier que chez les individus les plus anxieux, les effets inhibiteurs régulateurs des récepteurs GABA_A sont moins actifs. De la même manière pour les gènes codants des récepteurs μ -opioïdes qui semblent être sous-exprimés et qui s'avèrent avoir donc un rôle dans l'expression de l'anxiété. Par contre, les gènes codants des récepteurs 5-HT_{1A} et α_1 -adrénergiques se sont avérés plutôt sur-exprimés chez les animaux de niveau d'anxiété élevé. Ces différents constats mettent en évidence le caractère endogène de la manifestation de l'anxiété mais nous interpelle aussi sur le lien du niveau de cette anxiété avec le statut oxydatif qui en est corrélé. Nous pourrions par cette corrélation anxiété-stress oxydatif supposer que le niveau oxydatif dépendrait des facteurs endogènes et rend les individus inégaux face à leur fragilité devant les troubles ? Nous pourrions également supposer que le statut oxydatif important chez des individus de niveau d'anxiété élevé serait responsable de l'atteinte de l'expression des gènes codants donnant lieu à une sous-expression de certains et à la sur-expression des autres. Nous pourrions déduire de ces observations que la relation entre l'anxiété et le stress oxydant et dans l'état actuel des connaissances ne peut être envisagée dans un seul sens.

Au niveau des effets périphériques, l'ensemble des expériences réalisées a ainsi permis de mettre en évidence le lien possible entre le niveau d'anxiété, le stress anxiogène et la production des ERO qui seraient à l'origine des troubles immunitaires mis en évidence.

L'anxiété devient plus probablement pathologique quand elle présente une extrême et un caractère persistant (Vautrin et al., 2005). Les mécanismes du stress oxydatif ont été impliqués dans la pathogénèse de plusieurs troubles psychiatriques, y compris quelques troubles de l'anxiété (Kuloglu et al., 2002a,b; Ng et al., 2008). Cette hypothèse a un intérêt théorique, comme le cerveau est considéré particulièrement vulnérable au dommage oxydatif (Halliwell, 2006a; Ng et al., 2008). La présence du stress oxydatif dans le cerveau des souris anxieuses est donc délétère et peut induire une anxiété pathologique ou d'autres maladies liées aux effets toxiques des ERO. Le déséquilibre du système redox des cellules en faveur de la production incontrôlée des ERO a été observé dans les leucocytes du sang périphérique des souris anxieuses. Il est bien connu que le stress oxydatif inactive rapidement les propriétés phagocytaires et bactéricides des phagocytes (Splettstoesser and Schuff-Werner, 2002; Halliwell, 2006b). Les granulocytes sont l'une des premières cellules immunitaires innées effectrices à être recrutées sur le site de l'infection. Le recrutement ou le fonctionnement affaibli des granulocytes est négativement corrélé avec les apurements des bactéries (Rinaldi et al., 2007). Les granulocytes augmentent en cas d'infection, d'inflammation et de la réaction allergique (Rinaldi et al., 2007). Le dysfonctionnement du métabolisme oxydatif des granulocytes que l'on observe dans plusieurs pathologies est la première cause de la modification des fonctions vitales de ces phagocytes, augmentant les risques de l'infection et l'inflammation chronique (Yasunari et al., 2002; Kowalska et al., 2003; Hand et al., 2007). Le couplage de l'anxiété et du stress par contention rend l'organisme vulnérable aux infections, aux inflammations et aux maladies causées par l'augmentation du niveau d'oxydation entraînant des perturbations au niveau de certaines catégories cellulaires du système

immunitaire. Par conséquent, les souris anxieuses sont plus prédisposées aux infections et aux inflammations chroniques que les souris non-anxieuses. Le rôle des types particuliers des lymphocytes dans l'élimination des pathogènes, des cellules cancéreuses et des cellules infectées a été démontré (Espinoca and Chillet, 2006). Le stress oxydatif des lymphocytes aggrave l'atteinte du statut immunitaire des souris anxieuses potentialisant l'augmentation des risques aux infections et au cancer. Les tumeurs du cerveau chez les humains induisent des changements immunologiques comme une diminution du nombre des lymphocytes (Mahaley et al., 1977; Brooks et al., 1977), une baisse de l'activité des lymphocytes (Braun et al., 1982; Roszman and Brooks, 1982), et une diminution du rapport CD4/CD8 (Kril and Apuzzo, 1983). Nos résultats ont révélé que le stress par contention appliqué à des souris extrêmes en anxiété (anxieuses et non-anxieuses), rend l'organisme plus vulnérable aux maladies en diminuant le nombre des cellules TCD4⁺ et TCD8⁺ qui sont responsables de l'orchestration de la réponse immunitaire adaptative (Lucey et al, 1996) et une meilleure défense de l'organisme en situation pathologique. De telles atteintes peuvent également prédisposer l'organisme et ses fonctions à divers troubles tels que le cancer et d'autres infections surtout en connaissant le rôle de ces deux types des lymphocytes T effecteurs dans le contrôle des processus immunomoléculaires liés au cancer et dans l'élimination des infections (Salem, 2005). L'équilibre entre les cellules TCD4⁺ et TCD8⁺ a été suggéré pour refléter l'état immunologique aberrante induite par des maladies inflammatoires (Sakai et al., 1993; Pham et al., 1994; Fei et al., 1999; Khakoo et al., 1997), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Sharma et al., 1997), la maladie de Paget (Rapado et al., 1994), l'infection par le virus de la rougeole (Myou et al., 1993), et l'asthme (O'Sullivan et al., 2001). Les cellules NK constituent la première ligne de défense du corps contre les agents pathogènes viraux. Elles sont impliquées dans la surveillance immunitaire et jouent un rôle clé dans le contrôle et la lyse des cellules infectées par les virus. Chroniquement la faible activité des cellules NK chez

l'homme est associée à un accroissement de l'incidence et de la durée de l'infection, et une baisse de la survie au cours des infections virales (Levy et al., 1989; Levy et al., 1991). Ces résultats ont montré une diminution des cellules NK chez les souris anxieuses soumises à des situations stressantes par le stress par contention ce qui rend l'organisme fragile et moins résistant contre toutes maladies virales.

En résumé, le niveau d'anxiété élevé et le stress par contention aigu et subaigu exercent des effets suppresseurs sur certains composés au niveau périphérique de l'immunité aboutissant à une diminution significative de l'immunité cellulaire notamment les populations lymphocytaires y compris les TCD4⁺, TCD8⁺ et l'immunité humorale concernant la production des immunoglobulines (IgA, IgE et IgG).

En conclusion, le lien entre le niveau d'anxiété, le stress anxiogène et le statut oxydatif est de plus en plus évident et les travaux depuis une dizaine d'années vont dans le sens de le renforcer. Si ces liens sont aujourd'hui de plus en plus établis, il n'en reste moins que le sens de ces liens est loin d'être élucidé. Ainsi, Bouayed et al. (2007b) ont mis en évidence un lien entre le niveau d'anxiété et le taux des ERO dans les granulocytes. Dans notre travail de recherche, nous avons démontré que le niveau élevé de l'anxiété induit une production massive des ERO et par conséquent il induit le stress oxydant chez la souris (Rammal et al., 2008a,b). Tandis que d'autres équipes ont montré que le marqueur d'un stress oxydant (glyoxalase 1) est élevé chez les souris non anxieuses (Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006), des résultats différents avec d'autres qui ont montré que le glyoxalase 1 est élevé chez les souris anxieuses (Hovatta et al., 2005). L'ensemble des résultats obtenus nous permet de suggérer que le lien entre l'anxiété et le stress oxydant est dans le deux sens et ne peut être envisagé en relation uni-sens de cause à effet.

Deuxième partie

Recherche des effets des médicaments homéopathiques sur les troubles comportementaux et immunitaires induits par l'anxiété

Dans le cadre des collaborations de notre équipe, nous avons projeté de vérifier l'application des différents modèles validés sur les effets de certaines molécules, substances ou médicaments bioactifs. En effet, l'hypothèse de départ portait sur la réalité de l'activité d'un produit et surtout la véritable cible de ces produits. Ainsi, un produit dont les effets sont immunoactifs aurait-il le même effet sur des animaux dont le système immunitaire a été perturbé par l'anxiété ou le stress anxiogène ? De la même manière, d'autres produits dont les effets sont neuroactifs auraient-ils un effet sur le système immunitaire chez des animaux selon leur niveau d'anxiété et d'exposition au stress anxiogène ?

Il nous est apparu important dans cette perspective de redéfinir les profils pharmacologiques ou biologiques de certains produits bioactifs choisis à l'étude dans le cadre de nos partenariats.

Nous avons ainsi tenté d'évaluer à travers ces modèles des produits à hautes dilutions utilisés également pour les effets immunoactifs ou neuroactifs et issus des médicaments homéopathiques (*Gelsemium sempervirens*, *Poumon histamine* et *Histaminum*).

Evaluation des médicaments homéopathiques à profil anxiolytique ou immunotrope sur les animaux selon le niveau d'anxiété

1. Introduction

La médecine homéopathique est de plus en plus sollicitée malgré quelques paradigmes. En effet, elle repose sur des constats cliniques divers et semble contribuer à la santé publique sans grande reconnaissance. La raison de ceci est liée à l'absence des modèles scientifiques fondamentaux reconnus pour valider les effets des médicaments homéopathiques d'une part. En fait, les observations et les informations cliniques doivent être renforcées et validées par des méthodologies scientifiques sur l'efficacité et la bioactivité de ces médicaments. D'autre part, les très faibles doses efficaces pour ces médicaments présentent également un intérêt par rapport aux systèmes fonctionnels étudiés tels que le système nerveux central, le système immunitaire et le statut oxydatif cellulaire qui agissent à des doses d'une très faible concentration souvent également à celle des dilutions utilisées en homéopathie.

Nous avons pu à travers nos différents résultats apporter des réponses objectives sur la présence ou l'absence de l'activité des médicaments homéopathiques sur les différents systèmes étudiés. Ainsi, nous avons pu démontrer que l'extrait de *Gelsemium sempervirens* utilisé à de très haute dilution présentait un effet protecteur vis-à-vis de l'immunité mais principalement un effet neurotrope de type anxiolytique-like, ce qui nous a amené à conclure que l'effet central anxiolytic-like serait à l'origine de la protection immunitaire au niveau périphérique. De la même manière, les extraits de *Poumon histamine* et *Histaminum* utilisés également à de très haute dilution se sont avérés ainsi de forts potentiels immunoprotecteurs avec un effet central secondaire. Cette validation met en évidence l'intérêt de réaliser des évaluations croisées anxiolytique-immunotrope-antioxydant puisqu'il nous est apparu depuis

la mise en évidence des propriétés neurotropes d'un polyphénol aux effets antioxydants que la bioactivité d'un produit peut s'inscrire dans une activité principale ou secondaire à un autre effet non exploré.

Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés par la détermination des éventuels effets des médicaments homéopathiques (*Poumon histamine*, *Histaminum* et *Gelsemium sempervirens* L.) à faibles doses sur les réponses immunitaires et comportementales déjà citées, et donc, déterminer les propriétés pharmacologiques de ces médicaments par rapport aux altérations induites par le niveau élevé d'anxiété chez la souris.

Histaminum est préparé par dilutions de chlorhydrate d'histamine. Il est surtout utilisé pour des réactions allergiques cutanées.

Gelsemium sempervirens L. connu sous les noms de Jasmin jaune ou Jasmin de Caroline. Il est originaire du sud-est des Etats-Unis, le Jasmin jaune est un arbuste grimpant de la famille des Loganiacées. Il fut introduit en Europe au XVIIème siècle. La teinture mère est préparée essentiellement à partir de la racine de la plante. *G. sempervirens* est une plante médicinale qui possède des propriétés analgésiques sédatives (Valnet, 1992). Les principes actifs sont: gelsémine, sempervirine et gelsémicine (Demarque et al., 1995). Il possède un effet anxiolytique-like, des propriétés immunoprotectives et gastroprotectives (Bousta et al., 2001).

Poumon histamine est préparé à partir du poumon de cobaye sacrifié au cours d'un choc anaphylactique provoqué artificiellement par l'ovalbumine. *P. histamine* contient plusieurs médiateurs inflammatoires et allergiques, comme l'histamine, les leucotriènes,...etc. Il a été indiqué dans la régulation des mécanismes de la réaction allergique et surtout par les voies respiratoires (Demarque et al., 1995). Il possède un effet anxiolytique-like, des propriétés immunoprotectives et gastroprotectives (Bousta et al., 2001).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Animaux

Les animaux utilisés au cours de ce travail sont des souris SWISS mâles âgées de 10 semaines au moment des tests comportementaux dont leur conditionnement a été présenté précédemment.

2.2. Évaluation des effets comportementaux

Dans le but d'évaluer l'impact des médicaments homéopathiques à faibles doses sur le niveau d'anxiété des souris, nous avons utilisé le test de la CCO afin de distinguer les souris anxieuses (A) et les souris non anxieuses (NA) (Rammal et al., 2008a,b). Les souris ayant présenté un statut d'anxiété intermédiaire étaient exclues de l'étude. L'expérimentation s'est déroulée en triple aveugle sur 3 ans et a nécessité plus de 2500 souris. Les groupes (A et NA) correspondent à des souris traitées par des hautes dilutions des médicaments homéopathiques sur une période de 15 jours.

2.2.1. Administration des différents médicaments

Les différentes doses des médicaments homéopathiques ont été injectées quotidiennement par voie intrapéritonéale (i.p.), sur une période de 15 jours, aux souris anxieuses et non-anxieuses. À J15, nous avons refait le test de la CCO afin d'évaluer l'effet de chaque dilution sur le comportement de la souris. Le groupe témoin était composé des souris anxieuses et non-anxieuses injectées par quotidiennement i.p. par l'eau dynamisée à différentes doses.

2.3. Effets des médicaments homéopathiques sur l'immunité cellulaire et humorale

Les effets des médicaments homéopathiques sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, lymphocytes TCD4⁺, TCD8⁺ et cellules NK) et sur l'immunité humorale (immunoglobulines A, E et G) ont été évalués à travers deux techniques.

2.3.1. Cytométrie en flux pour l'immunité cellulaire

En utilisant cette technique décrite ultérieurement, nous avons déterminé le nombre des granulocytes, des monocytes, des lymphocytes totaux, des lymphocytes TCD4⁺, TCD8⁺ et des cellules NK dans 10000 événements dans le sang de la souris.

2.3.2. ELISA pour l'immunité humorale

Cette technique décrite précédemment, nous a permis de quantifier les immunoglobulines (A, E et G) dans le sang des souris ayant été injectées par les différentes doses des médicaments homéopathiques et de l'eau dynamisée.

2.3.3. Procédure expérimentale

À la réception des animaux, nous effectuons un tri selon le niveau d'anxiété à l'aide de test de la CCO. Après les avoir séparé à J1 selon leur niveau d'anxiété, nous avons utilisé un lot de 20 souris anxieuses et un autre lot de 20 souris non anxieuses. Ensuite, le traitement par les différentes dilutions des médicaments par voie *i.p.* a été mis en place à J1. Une demi-heure après l'injection, les souris anxieuses et les souris non anxieuses ont été sacrifiées afin de récupérer leur sang qui a servi à la réalisation des dosages immunitaires (cytométrie en flux et ELISA). Les souris restantes ont subi des traitements, quotidiennement jusqu'à J15 où leur niveau d'anxiété a été de nouveau évalué par la CCO afin de déterminer l'effet des traitements

sur leurs comportements. Ensuite, elles ont été sacrifiées afin de récupérer leur sang qui a servi à la réalisation des dosages immunitaires.

2.4. Analyses statistiques

Les données sont représentées par leur moyenne \pm ESM. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées en utilisant le logiciel Statview[®] 4.5 (Abacus Concepts, Inc.) et le seuil de significativité a été fixé à $P < 0.05$. L'analyse statistique paramétrique a été réalisée par l'ANOVA suivi du test PLSD de Fisher lorsque le nombre des groupes comparés est supérieur à deux. Le test de Student a été utilisé pour comparer 2 groupes non-appariés. L'analyse statistique non paramétrique a été réalisée par le test Kruskal–Wallis suivi par le test Mann–Whitney U.

3. Résultats

3.1. Effet de *Gelsemium sempervirens* sur les marqueurs comportementaux

3.1.1. Effet sur la latence de sortie

Le *Gelsemium sempervirens* à différentes doses (9CH, 15CH et 30CH) et plus particulièrement à la dose 30CH a entraîné une diminution significative ($P < 0.05$) de la latence de sortie chez les souris en comparaison avec le groupe témoin (Fig. 6). Le flumazénil, un agoniste inverse du récepteur GABA, a empêché l'effet de ce médicament sur la latence (Fig. 6).

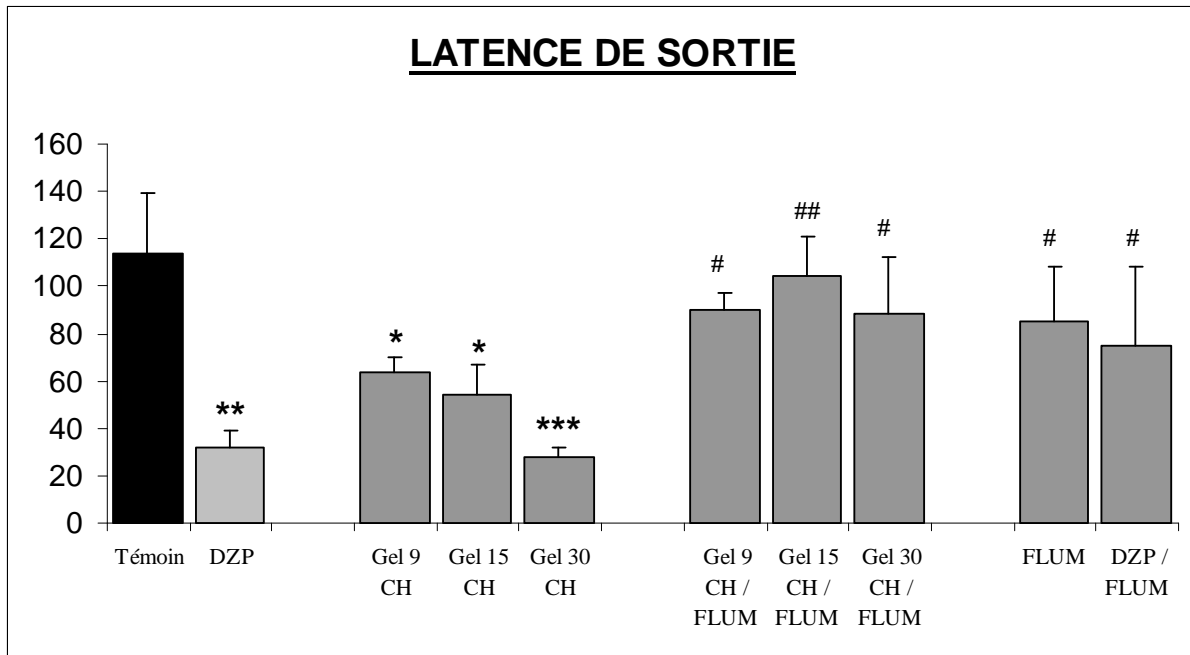


Figure 6. Effets des différentes doses de *Gelsemium sempervirens* sur la latence de sortie des souris. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.001$. Les données sont exprimées en moyenne \pm ESM (n=10). Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher.**

3.1.2. Effet sur le nombre de sorties

Le *Gelsemium sempervirens* à différentes doses (9CH, 15CH et 30CH) et plus particulièrement à la dose 30CH a augmenté significativement ($P < 0.05$) le nombre de sorties chez les souris en comparaison avec le groupe témoin (Fig. 7), cette augmentation a atteint le même niveau que le diazépam. Le flumazénil, un agoniste inverse du récepteur GABA, a empêché l'effet de ce médicament sur le nombre de sorties (Fig. 7).

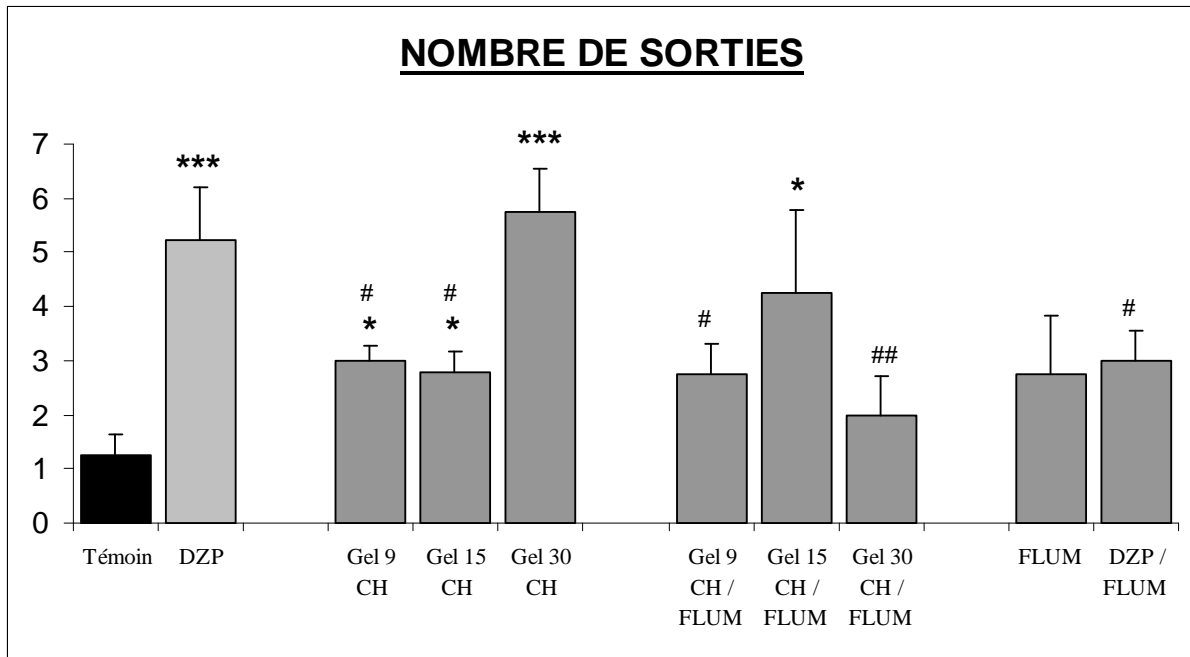


Figure 7. Effets des différentes doses de *Gelsemium sempervirens* sur le nombre de sorties des souris. *P<0.05; **P<0.01; *P<0.001. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=10). Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher.**

3.1.3. Effet sur le temps cumulé dans la chambre claire

Le *Gelsemium sempervirens* à différentes doses (9CH, 15CH et 30CH) et plus particulièrement à la dose 30CH a augmenté significativement (P<0.05) le temps cumulé par les souris dans la chambre claire en comparaison avec le groupe témoin (Fig. 8). Cette augmentation a dépassé l'augmentation induite par le diazépam. Le flumazénil, un agoniste inverse du récepteur GABA, a empêché l'effet de ce médicament sur le temps cumulé dans la chambre claire (Fig. 8).

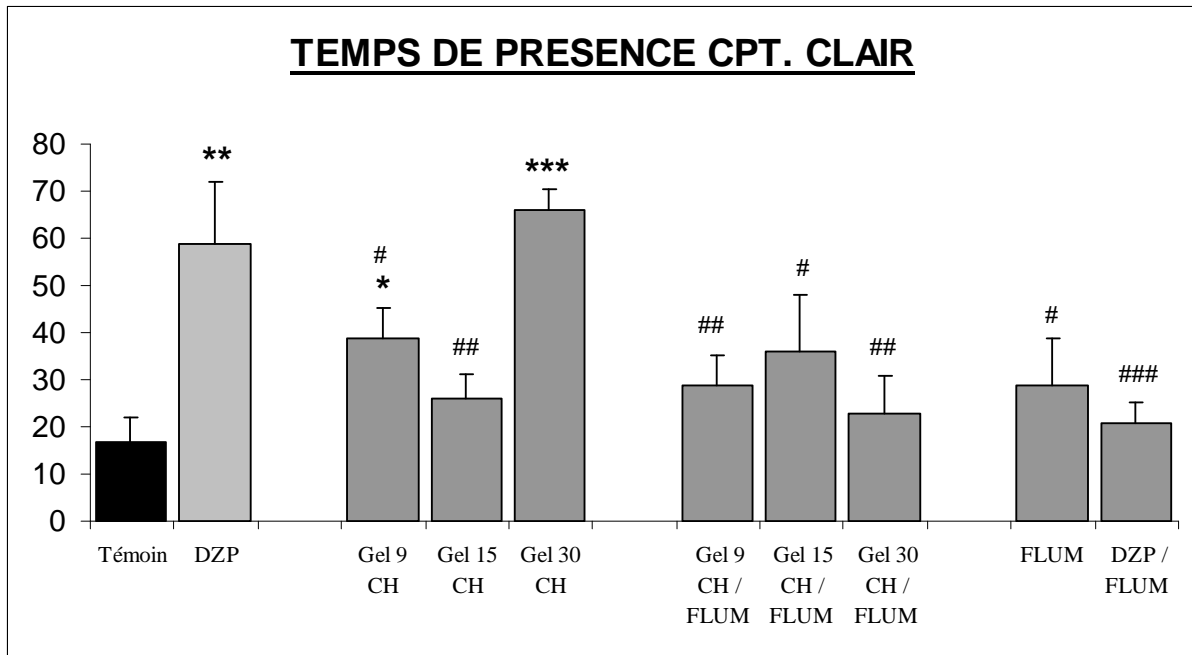


Figure 8. Effets des différentes doses de *Gelsemium sempervirens* sur le temps cumulé dans la chambre claire par les souris. *P<0.05;P<0.01;***P<0.001. Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n=10). Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher.**

3.2. Effets des médicaments homéopathiques sur l'immunité cellulaire et humorale

3.2.1. Effet du *Gelsemium sempervirens* sur l'immunité cellulaire

Les résultats obtenus après analyses statistiques montrent d'une part que l'administration aigüe du *Gelsemium sempervirens* à la dilution 9 CH a induit une diminution significative du nombre des monocytes, alors que la dilution 15 CH a augmenté significativement le nombre des lymphocytes totaux, et des TCD4⁺, elle a diminué d'une manière significative le nombre des granulocytes, des monocytes et des cellules NK (Tableau 12). D'autre part, l'administration chronique de la dilution 9 CH a induit une augmentation significative du nombre des lymphocytes totaux, des TCD4⁺ et des TCD8⁺ et en même temps une diminution significative du nombre des granulocytes et des monocytes (Tableau 12). L'administration chronique de la dilution 15 CH a provoqué une diminution significative seulement du nombre des cellules NK. Tandis que la dilution 30 CH a entraîné une

diminution significative du nombre des lymphocytes totaux, des granulocytes et des monocytes (Tableau 12).

		Groupes	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes	TCD4 ⁺	TCD8 ⁺	NK
J1	9 CH	Témoin NA	4048 ± 352	3092 ± 328	171 ± 17	2172 ± 221	500 ± 55	269 ± 24
		Témoin A	3769 ± 314	3040 ± 294	171 ± 26	2056 ± 180	557 ± 70	320 ± 60
		Gelsemium A	3881 ± 355	2502 ± 322	119 ± 15 *	2029 ± 210	545 ± 58	331 ± 67
	15 CH	Témoin NA	4420 ± 355	3232 ± 153	151 ± 18	2174 ± 199	564 ± 70	315 ± 93
		Témoin A	3548 ± 238	3670 ± 313	194 ± 14	1754 ± 153	513 ± 71	318 ± 49
		Gelsemium A	4183 ± 425 *	2714 ± 312 *	118 ± 12 **	2363 ± 250 *	509 ± 54	175 ± 29 *
	30 CH	Témoin NA	5696 ± 479	2032 ± 298	129 ± 15	2772 ± 353	774 ± 99	377 ± 49
		Témoin A	3924 ± 221	3145 ± 298	155 ± 14	2015 ± 186	606 ± 30	327 ± 42
		Gelsemium A	4187 ± 234	2561 ± 235	133 ± 12	1991 ± 93	604 ± 29	360 ± 70
J15	9 CH	Témoin NA	4303 ± 429	1628 ± 345	146 ± 22	2354 ± 239	596 ± 73	236 ± 27
		Témoin A	3188 ± 345	2393 ± 249	155 ± 37	1754 ± 169	366 ± 31	228 ± 48
		Gelsemium A	4224 ± 207 *	1693 ± 264 *	88 ± 7 *	2096 ± 119 *	574 ± 35 **	339 ± 87
	15 CH	Témoin NA	4094 ± 472	3787 ± 556	165 ± 53	2489 ± 311	633 ± 76	235 ± 84
		Témoin A	3548 ± 238	2966 ± 639	145 ± 22	2142 ± 308	578 ± 70	210 ± 30
		Gelsemium A	4240 ± 423	2744 ± 487	114 ± 23	2306 ± 270	628 ± 92	345 ± 96 *
	30 CH	Témoin NA	2710 ± 421	2884 ± 697	154 ± 17	1809 ± 272	442 ± 65	241 ± 38
		Témoin A	3553 ± 275	2945 ± 500	162 ± 40	1673 ± 277	417 ± 61	258 ± 39
		Gelsemium A	2758 ± 352 *	1512 ± 262 *	107 ± 23 **	2029 ± 206	453 ± 66	266 ± 96

Tableau 12. Effet de *Gelsemium sempervirens* sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et NK) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le groupe témoin et groupe traité par *Gelsemium*. *P<0.05;**P<0.01.

3.2.2. Effet du *Gelsemium sempervirens* sur l'immunité humorale

Les résultats obtenus après analyses statistiques montrent que l'administration aiguë du *Gelsemium sempervirens* à la dilution 9 CH a induit une augmentation significative de la concentration des immunoglobulines (A, E et G). Les dilutions 15 CH et 30 CH ont induit une augmentation significative de la concentration des IgE et IgG (Tableau 13).

L'administration chronique des différentes dilutions de *G. sempervirens* a provoqué une augmentation significative de la concentration des IgE seulement (Tableau 13).

Groupes	J1						J15					
	IgA		IgE		IgG		IgA		IgE		IgG	
	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A
Témoin 9CH	30±9	11±0.8	4±0.8	4±1	2±0.1	2.1±0.3	17.2±3	23±7	6±1	4.3±0.8	2.3±0.1	9.2±4
Témoin 15CH	25.4±5.6	26.3±8	4±0.9	5±1	2.1±0.3	3±0.4	17.4±2	12±0.9	5±0.8	3.3±0.5	2.5±0.3	2.3±0.3
Témoin 30CH	29±9	21±5	4.3±1.5	4±1	2±0.1	2.4±0.9	19.2±2	13.4±1.6	5±0.7	4±0.6	2.2±0.3	4±0.9
Gel 9CH	45.3±15	37.1±11 *	66±34	37±18 **	6±3	7±3.7 *	47±13	23±6	34.2±14	13±4 **	10±4	3.2±0.3
Gel 15CH	40.3±12.6	31±9	28±9.8	23.1±9 **	8±4.5	6.4±3.4 *	42±13.7	22±5	41±21	14.1±5 **	4±0.6	3.4±0.5
Gel 30CH	24±5	18±2.7	18.2±4.5	18±6 **	5.4±2	6±1.8 **	38±8.6	21.4±8	32.5±15	16±5 **	6±1	4±0.6

Tableau 13. Effet de *Gelsemium sempervirens* sur l'immunité humorale (IgA, IgE et IgG) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le groupe témoin anxieux et le groupe anxieux traité par *Gelsemium sempervirens*. *P<0.05;P<0.01.**

3.2.3. Effet du *Poumon Histamine* sur l'immunité cellulaire

L'administration aiguë du *Poumon histamine* à la dose 9 CH a induit une diminution significative du nombre des monocytes. À la dose 15 CH cette administration a augmenté significativement le nombre des TCD4⁺ et des cellules NK. La dose 30 CH a augmenté significativement le nombre des cellules NK (Tableau 14).

L'administration chronique à différentes doses (9 CH, 15 CH et 30 CH) a induit une diminution significative du nombre des granulocytes et des monocytes, et une augmentation significative du nombre des TCD4⁺ et des cellules NK (Tableau 14).

		Groupes	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes	TCD4 ⁺	TCD8 ⁺	NK
J1	9 CH	Témoin NA	4681 ± 397	2483 ± 337	168 ± 22	2463 ± 211	803 ± 175	294 ± 44
		Témoin A	4414 ± 264	1771 ± 120	160 ± 22	2407 ± 141	676 ± 82	443 ± 93
		P histamine A	4536 ± 210	1907 ± 224	115 ± 8 *	2274 ± 140	541 ± 24	374 ± 51
	15 CH	Témoin NA	4611 ± 343	3183 ± 286	192 ± 25	2375 ± 175	636 ± 68	374 ± 63
		Témoin A	3888 ± 220	2694 ± 325	160 ± 18	1900 ± 97	631 ± 57	243 ± 53
		P histamine A	4093 ± 336	2619 ± 278	137 ± 8	2188 ± 97 *	582 ± 99	382 ± 106 *
	30 CH	Témoin NA	4701 ± 218	2523 ± 307	161 ± 29	2332 ± 207	642 ± 44	464 ± 53
		Témoin A	4224 ± 309	2613 ± 432	143 ± 19	1792 ± 147	544 ± 47	277 ± 27
		P histamine A	4412 ± 307	2452 ± 176	196 ± 39	2125 ± 169	568 ± 51	425 ± 69 *
J15	9 CH	Témoin NA	4080 ± 344	2402 ± 389	181 ± 37	1939 ± 200	585 ± 59	365 ± 52
		Témoin A	3949 ± 514	2180 ± 479	168 ± 38	2059 ± 298	546 ± 64	235 ± 35
		P histamine A	3957 ± 430	1303 ± 138 *	83 ± 6 *	2050 ± 196	523 ± 73	329 ± 64
	15 CH	Témoin NA	4473 ± 366	1794 ± 325	132 ± 25	1417 ± 262	858 ± 135	227 ± 27
		Témoin A	3415 ± 540	3263 ± 651	191 ± 37	1361 ± 171	476 ± 93	181 ± 16
		P histamine A	3609 ± 497	2231 ± 440 *	126 ± 19 *	2138 ± 257 *	514 ± 79	299 ± 68 *
	30 CH	Témoin NA	3768 ± 527	1837 ± 171	133 ± 18	1828 ± 231	478 ± 72	317 ± 57
		Témoin A	2885 ± 536	3916 ± 632	147 ± 28	1505 ± 303	383 ± 54	286 ± 63
		P histamine A	3695 ± 445	2189 ± 359 *	122 ± 25	2109 ± 270	525 ± 73	161 ± 23 *

Tableau 14. Effet du *Poumon histamine* sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et NK) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le témoin et *Poumon histamine*. *P<0.05.

3.2.4. Effet du *Poumon Histamine* sur l'immunité humorale

L'administration aiguë et chronique du *Poumon histamine* à différentes doses (9 CH, 15 CH et 30 CH) a induit une augmentation significative de la concentration des immunoglobulines (A, E et G) (Tableau 15).

	J1						J15					
	IgA		IgE		IgG		IgA		IgE		IgG	
	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A
Témoin 9CH	20±4	28.4±7	4±1	4.3±1	2.2±0.3	2±0.3	21.5±4	13±1	5.3±1	3.4±0.5	3.4±0.7	3±0.5
Témoin 15CH	22.1±6	13±2	4.4±1	4±1	2±0.1	2±0.3	16.5±2	14±1	4±0.5	4±0.6	3±0.5	4±0.7
Témoin 30CH	28±9	16±3	6±2.6	5±2	2.1±0.2	2±0.1	25.5±6	13.3±1	5.3±1	3.1±0.3	5±1	3±0.5
Phistamine 9CH	23.4±6	24±9	22.2±6	16±5 *	5±1	6±1 **	29.3±5	14±2	17±6	8±2 *	4±0.8	3±0.2
Phistamine 15CH	29.5±7	38.5±12 *	25.2±9	45±20 **	5.4±2	7.5±2 **	38.3±15	47.5±17 *	19±5	33±16 **	3.4±0.4	6±0.8 *
Phistamine 30CH	30±10	34.4±13 *	35±17	28.5±11 ***	5.1±2	7±2 **	40.3±12	48.5±19 **	24.3±10	13±3 **	4±0.8	5.4±1 *

Tableau 15. Effet du *Poumon histamine* sur l'immunité humorale (IgA, IgE et IgG) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le groupe témoin anxieux et le groupe anxieux traité par *Poumon histamine*. *P<0.05;P<0.01;***P<0.001.**

3.2.5. Effet de *Histaminum* sur l'immunité cellulaire

L'administration aiguë de *Histaminum* à différentes doses a induit une diminution significative du nombre des granulocytes et des monocytes. Aux doses 9 CH et 15 CH, cette administration a augmenté significativement le nombre des lymphocytes TCD4⁺ (Tableau 16). L'administration chronique à différentes doses (9 CH, 15 CH et 30 CH) a induit une diminution significative du nombre des granulocytes et des monocytes. À la dose 9 CH, elle a provoqué une augmentation significative du nombre des lymphocytes totaux, des TCD4⁺ et des TCD8⁺ (Tableau 16).

		Groupes	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes	TCD4 ⁺	TCD8 ⁺	NK
J1	9 CH	Témoin NA	4222 ± 307	2666 ± 318	176 ± 18	2143 ± 126	531 ± 39	368 ± 68
		Témoin A	3684 ± 304	2992 ± 188	174 ± 18	1902 ± 183	564 ± 57	416 ± 33
		Histaminum A	4498 ± 446	1785 ± 169 ***	127 ± 11 *	2563 ± 246 *	531 ± 56	280 ± 75 *
	15 CH	Témoin NA	4604 ± 330	2451 ± 226	148 ± 19	2356 ± 165	696 ± 92	475 ± 78
		Témoin A	4394 ± 132	2737 ± 271	170 ± 19	1895 ± 91	626 ± 58	328 ± 68
		Histaminum A	4682 ± 310	1788 ± 252 *	125 ± 11 *	2279 ± 155 *	595 ± 56	309 ± 44
	30 CH	Témoin NA	3983 ± 363	3251 ± 227	168 ± 20	2013 ± 194	531 ± 68	301 ± 55
		Témoin A	4265 ± 235	2616 ± 290	181 ± 34	2148 ± 146	700 ± 65	318 ± 57
		Histaminum A	4672 ± 298	1902 ± 169 *	119 ± 10 *	2293 ± 126	601 ± 59	333 ± 58
J15	9 CH	Témoin NA	3825 ± 317	2517 ± 167	163 ± 24	2111 ± 212	568 ± 62	132 ± 18
		Témoin A	2734 ± 464	3655 ± 675	228 ± 54	1375 ± 197	389 ± 62	176 ± 37
		Histaminum A	4266 ± 434 *	1770 ± 298 *	131 ± 21 *	2339 ± 222 **	560 ± 67 *	237 ± 48
	15 CH	Témoin NA	3627 ± 326	2767 ± 606	217 ± 45	1980 ± 234	501 ± 49	220 ± 27
		Témoin A	3101 ± 382	2949 ± 585	242 ± 92	1706 ± 260	499 ± 74	250 ± 95
		Histaminum A	3840 ± 353	1738 ± 275 *	107 ± 13 *	2027 ± 149	487 ± 49	235 ± 39
	30 CH	Témoin NA	4109 ± 447	2805 ± 604	149 ± 18	2121 ± 204	585 ± 66	307 ± 65
		Témoin A	4024 ± 342	2380 ± 296	204 ± 40	1989 ± 197	595 ± 69	296 ± 53
		Histaminum A	4182 ± 396	1818 ± 349	142 ± 38 *	2232 ± 198	528 ± 57	263 ± 60

Tableau 16. Effet de *Histaminum* sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et NK) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le groupe témoin et le groupe traité par *Histaminum*. *P<0.05; **P<0.01; *P<0.001.**

3.2.6. Effet de *Histaminum* sur l'immunité humorale

L'administration aiguë et chronique de *Histaminum* à différentes doses (9 CH, 15 CH et 30 CH) a induit une augmentation significative de la concentration des immunoglobulines (A, E et G) (Tableau 17).

	J1						J15					
	IgA		IgE		IgG		IgA		IgE		IgG	
	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A	NA	A
Témoin 9CH	21±6	15±1.9	4.1±1	4.2±1.6	2±0.1	2.2±0.3	22.2±5	16.4±3.8	6±1	4.2±1	6±2	3.3±0.5
Témoin 15CH	14.1±1.6	20±4.8	3.5±1	4±0.9	2±0.3	3±0.5	18.3±2.9	10.1±0.6	5.1±0.8	3.1±0.6	4±0.7	3±0.6
Témoin 30CH	34±9.8	51±17	4.3±1	4.3±1	2.5±0.4	2±0.1	29.2±6.7	12±1.5	6±0.9	3.4±0.5	6±1	3±0.4
Histaminum 9CH	25±7	21.1±4	24±8	17.1±4.6 **	5±2	2.3±0.2	28±5.7	47.3±22 *	18±6.9	21±8 **	3±0.4	3.4±0.5
Histaminum 15CH	22±3.9	28±10	19±5	57.1±35 **	5±2	5±1.5 *	47±13.9	34.2±11 *	27.5±10.8	16±6 **	3.4±0.5	5±0.9 *
Histaminum 30CH	26.4±7	19.1±3 *	24±9.3	22.1±9 **	5.2±2	5±1.9 **	39±16	34.5±14	24±9	62±48 *	4±0.6	6±1.6 *

Tableau 17. Effet de *Histaminum* sur l'immunité humorale (IgA, IgE et IgG) chez des souris anxieuses et non anxieuses. Les analyses statistiques sont réalisées par le test de l'ANOVA suivi par le test de Fisher. Les comparaisons ont été faites entre le témoin anxieux et le groupe anxieux traité par *Histaminum*. *P<0.05;P<0.01.**

4. Discussion et conclusion

Dans le cadre de l'application des différents modèles validés, nous avons entamé cette étude pharmacologique expérimentale afin de vérifier des effets d'un médicament homéopathique de profil anxiolytic-like sur l'immunité et d'un autre médicament de profil immunoactif sur l'anxiété chez des animaux de niveau différent d'anxiété.

Nous avons ainsi entrepris cette étude expérimentale dans laquelle nous avons étudié les effets des hautes dilutions (9 CH, 15 CH et 30 CH) du *Gelsemium sempervirens*, *Histaminum* et *Poumon histamine* sur le niveau d'anxiété d'une part et sur l'immunité cellulaire (granulocytes, monocytes, lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et cellules NK) et humorale (immunoglobulines A, E et G) des souris avec des niveaux d'anxiété opposés évalués par le test de la CCO d'autre part.

L'utilisation des souris ayant des niveaux d'anxiété opposés (anxieuses et non anxieuses) nous permet une meilleure détermination des effets nuisibles physiologiques associés à l'anxiété (Rammal et al., 2008a,b). Nos résultats obtenus lors de cette étude ont montré d'une part que le *Gelsemium sempervirens* possède un effet neuroactif, anxiolytic-like à différentes dilutions (9 CH, 15 CH et 30 CH) et plus particulièrement à la dilution 30 CH. Cet effet a été comparable à celui obtenu par une molécule anxiolytique de référence, le diazépam. D'autre part, ce médicament homéopathique a montré des effets immunotropes à différentes doses étudiées. L'administration aiguë à la dose 15 CH de *Gelsemium sempervirens* induit un effet immunotrope sur les lymphocytes totaux, les TCD4⁺ chez les souris anxieuses, tandis que l'administration chronique à la dose 9 CH de ce médicament induit un effet immunotrope sur les lymphocytes totaux, les TCD4⁺, les TCD8⁺ et les granulocytes chez les souris anxieuses. L'administration chronique à la dose 30 CH de *Gelsemium sempervirens* induit un effet immunotrope seulement sur les lymphocytes totaux chez les souris anxieuses. En même temps, l'administration aiguë de *Gelsemium sempervirens*

à la dose 15 CH s'est opposée à l'effet de l'anxiété sur les granulocytes et les monocytes, alors que seuls les monocytes ont été protégés de l'effet de l'anxiété par l'administration chronique de *Gelsemium sempervirens* aux doses 9 CH et 30 CH.

Concernant l'immunité humorale, le *Gelsemium sempervirens* a induit une stimulation significative de l'IgA seulement à la dose 9 CH, une stimulation significative de l'IgG aux doses 9 CH et 30 CH. Quant à l'IgE, *Gelsemium sempervirens* a provoqué une stimulation significative aux différentes doses (9 CH, 15 CH et 30 CH).

Ces résultats obtenus montrent que *Gelsemium* possède un effet protecteur au niveau de l'immunité cellulaire sur les différentes catégories des cellules immunitaires avec un léger effet immunostimulant sur les immunoglobulines. De plus, nous avons montré que ce médicament homéopathique possède un effet anxiolytique-like. Ces résultats sont en accord avec d'autres obtenus par Bousta et al. (2001) qui ont démontré l'effet anxiolytique du *Gelsemium* chez des animaux stressés. Ces résultats nous permettent de conclure que l'effet anti-stress du *Gelsemium* serait principalement central.

Avec ces différents constats dont il faudrait affiner et confirmer aussi les effets, nous pensons qu'il existe des effets cytoprotecteurs au niveau des cellules et nous supposons que les effets protecteurs sur les cellules immunitaires seraient probablement liés aux effets anxiolytiques (anti-anxiété) de *Gelsemium*. Ces effets nous interpellent par rapport au pouvoir cytoprotecteur que pourrait présenter le *Gelsemium* et probablement la gelsémine ou autre dérivé présent à très faible concentration dans les médicaments testés.

L'administration aiguë et chronique à la dose 15 CH d'*Histaminum* a montré un effet immunotrope seulement sur les TCD4⁺. De la même façon, l'administration chronique à la dose 9 CH a montré un effet immunotrope sur les TCD4⁺ et TCD8⁺.

Le *Poumon histamine* en administration aiguë à la dose 15 CH a montré un effet immunotrope sur les TCD4⁺ et les NK, alors que la dose 30 CH a agi seulement sur les cellules NK. En plus, l'administration chronique à la dose 15 CH du *Poumon histamine* a induit à la fois un effet protecteur de l'altération induite par l'anxiété sur les lymphocytes totaux et un effet immunotrope sur les monocytes.

Les effets protecteurs de *Poumon Histamine* et *Histaminum* sur l'immunité cellulaire sont plus modestes que ceux du *Gelsemium sempervirens* mais les effets stimulants sur l'immunité humorale sont plus fréquents et plus significatifs ce qui nous laisse penser à un fort effet immunostimulant. Boustia et al. (2001) ont démontré un effet anxiolytique-like de ces médicaments homéopathiques chez des animaux stressés. Ces résultats nous laissent conclure que les effets anti-stress seraient principalement immunitaires.

En conclusion, les trois médicaments homéopathiques aux différentes doses, utilisés lors de notre travail de recherche, se sont opposés aux effets de l'anxiété sur certains paramètres immunitaires évalués. *Gelsemium sempervirens* s'est avéré aussi des effets immunoactifs conséquent aux effets anxiolytiques, ce qui montre que l'impact protecteur sur les effets de l'anxiété peut engendrer un effet protecteur périphérique. De la même manière, les effets immunoactifs de *Poumon histamine* et *Histaminum* semblent être l'effet principal avec un effet notoire sur l'anxiété. Certains médicaments sont actifs à certaines dilutions et à certaines durées. Les recommandations dans la clinique homéopathique sur les traitements chronique et aigu et sur les différentes dilutions utilisées pourraient être reposées sur quelques observations de nos résultats puisque à certaines dilutions, l'activité apparaît significativement et pour certaines dilutions, l'activité est significativement liée à la durée du traitement.

Nous pourrions aussi apporter quelques observations sur l'intérêt de protéger nos systèmes fonctionnels des altérations induites par l'anxiété « trait et endogène » et aussi « état

et environnemental » *via* le stress oxydant, par des produits ou des substances couplant les effets positifs sur l'anxiété et aussi sur le stress oxydatif. Des produits dont le profil double neuroactif-antioxydant pourrait présenter des effets bénéfiques cytoprotecteurs et aussi préventifs. C'est de cette manière que nos travaux sur les médicaments homéopathiques ou sur d'autres substances naturelles telles que les polyphénols de nombreux agroressources étudiées au sein de notre équipe, ont donné lieu à des validations scientifiques d'un intérêt nous semblant être très important pour la santé mais aussi pour la nutrition en lien avec l'environnement.

Nous pourrions encore renforcer ces travaux par la recherche du véritable sens de la relation Anxiété-Stress oxydant dans la genèse des troubles mais aussi tenter d'évaluer les effets nuisibles du stress chimique lié à la pollution de notre environnement et encore de faire des études croisées sur les produits et substances cytoprotecteurs sur l'anxiété et des substances neuroactives sur le statut oxydatif surtout qu'il est de plus en plus admis que certains polyphénols alimentaires ont deux effets, cytoprotecteur et anxiolytique (Vignes et al., 2006; Bouayed et al., 2007a).

REFERENCES

Références bibliographiques

- Adamec R, 1997. Transmitter systems involved in neural plasticity underlying increased anxiety and defense: implications for understanding anxiety following traumatic stress. *Neurosci Biobehav Rev* 21, 755-765.
- Ahmed SH, Koob GB, 1997. Cocaine- but not food-seeking behaviour is reinstated by stress after extinction. *Psychopharmacology* 32, 289-295.
- Allen NJ, Rossi DJ, Attwell D, 2004. Sequential release of GABA by exocytosis and reversed uptake leads to neuronal swelling in simulated ischemia of hippocampal slices. *J Neurosci* 24, 3837-3849.
- Allez M, Mayer L, 2004. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 10, 666-676.
- Anisman H, Zacharko RM, 1990. Multiple neurochemical and behavioural consequences of stressors: implications for depression. *Pharmacol ther* 46, 119-136.
- Beckman KB, Ames BN, 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Belloc F, 1991. Principle of the Flow Cytometer. *Revue Française des Laboratoires* 218, 21-27.
- Belzung C, 1999. Measuring rodent exploratory behavior. Chapitre invité dans “ Handbook of Molecular genetic techniques for brain and behavior research” techniques in the behavioural and neural sciences, Éditeurs : Wim E. Crusio et Robert Gerlai, Elsevier, Amsterdam 13, 739-749.
- Belzung C, Griebel G, 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res* 125, 141-149.
- Belzung C, Le Pape G, 1994. Comparison of different behavioral test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiol Behav* 56, 623-628.

- Belzung C, Misslin R, Vogel E, 1989. Behavioural effects of the benzodiazepine receptor partial agonist RO 16-6028 in mice. *Psychopharmacology* 97, 388-391.
- Belzung C, Misslin R, Vogel E, Dodd RH, Chapouthier G, 1987. Anxiogenic effects of methyl h-carboline-carboxylate in a light/dark choice situation. *Pharmacol Biochem Behav* 28, 29 –33.
- Belzung C, Pineau N, Beuzen A, Misslin R, 1994. PD135158, a CCK-B antagonist, reduces “state”, but not “trait” anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 49, 433–436.
- Bilici M, Efe H, Koroglu MA, Uydu HA, Bekaroglu M, Deger O, 2001. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J Affect Disord* 64:43–51.
- Blumstein LK, Crawley JN, 1983. Further characterization of a simple, automated exploratory model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 18, 37–40.
- Bormann J, 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends pharmacol Sci* 21, 16-19.
- Bouayed J, Rammal H, Dicko A, Younos C, Soulimani R, 2007a. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* 262, 77–84.
- Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R, 2007b. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 546, 146-149.
- Bourin M, 2004. Pharmacologie du récepteur GABAA. Dans : « Anxiété, anxiolytiques et troubles cognitifs », Editeur Ferreri M, Elsevier, Paris, pp.47–57.
- Bourin M, Hascoët M, 2003. The mouse light/dark box test. *Eur J Pharmacol* 463, 55– 65.
- Bousta-er raji D, 2001. Effets du stress expérimental sur les réponses comportementale, gastrique, immunitaire et endocrinienne : implications et interactions des récepteurs

- opioïdes et benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire chez la souris stressée. Thèse, Université de Metz.
- Bowers SL, Bilbo SD, Dhabhar FS, Nelson RJ, 2008. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun* 22 (1), 105-113.
- Bowman RE, MacLusky NJ, Sarmiento Y, Frankfurt M, Gordon M, Luine VN, 2004. Sexually dimorphic effects of prenatal stress on cognition, hormonal responses, and central neurotransmitters. *Endocrinology* 145, 3778–3787.
- Braun DP, Penn RD, Flannery AM, Harris JE, 1982. Immunoregulatory cell function in peripheral blood leukocytes of patients with intracranial gliomas. *Neurosurgery* 10, 203–209.
- Briley M, Chopin P, Moret C, 1990. Effects of serotonin lesions on anxious behaviour measured in the elevated-plus-maze test in the rat. *Psychopharmacology* 101, 187–189.
- Brooks WH, Roszman TL, Mahaley MS, Woosley RE, 1977. Immunobiology of primary intracranial tumors. *Exp Immunol* 29, 61–6.
- Buezek Y, Lê AD, Wang A, Stewart J, Shaham Y, 1999. Stress reinstates nicotine seeking but not sucrose solution seeking in rats. *Psychopharmacology* 144, 183-188.
- Cabib S, Puglisi-Allegra S, 1996. Stress, depression and the mesolimbic dopamine system. *Psychopharmacology* 128, 331-342.
- Cadenas E, 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58, 79–110.
- Cancela LM, Bregonzio C, Molina VA, 1995. Anxiolytic-like Effect Induced by Chronic Stress Is Reversed by Naloxone Pretreatment. *Brain Res Bull* 36 (3), 209-213.
- Caramaschi D, de Boer SF, Koolhaas JM, 2007. Differential role of the 5-HT1A receptor in aggressive and non-aggressive mice: An across-strain comparison. *Physiol Behav* 90, 590–601.

- Carini M, Giancarlo A, Piccone M, Facino RM, 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Il Farmaco* 55, 526–534.
- Chamberlain P, 2002. Immunogenicity of therapeutic proteins Part 1: Causes and clinical manifestations of immunogenicity. *The Regulatory Review* 5, 4-9.
- Chopin P, Briley M, 1987. Animal models of anxiety: the effect of compounds that modify serotonergic function. *Trends Pharmac Sci* 8, 383–388.
- Cohen S, Kessler RC, Gordon LU, 1995. Strategies for measuring stress in studies of psychiatric and physical disorders. In: Cohen, S., Kessler, R.C., Gordon, L.U. (Eds.), *Measuring Stress: A Guide for Health and Social Scientists*. Oxford University Press, New York, NY, pp. 3–26.
- Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM, 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 32 (3), 777–785.
- Craig KJ, Brown KJ, Baum A, 2000. Environmental factors in the etiology of anxiety.
- Crawley JN, 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 15, 695–699.
- Crawley JN, Goodwin FK, 1980. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 13, 167–170.
- Csaba G, Kovács P, Pállinger Éva, 2007. Increased hormone levels in *Tetrahymena* after longlasting starvation. *Cell Biol Int* 31 (9), 924–928.
- Cunnick JE, Lysle DT, Armfield A, Rabin BS, 1988. Shock-induced modulation of lymphocyte responsiveness and natural killer activity: differential mechanisms of induction. *Brain Behav Immun* 2, 102–113.

- Dailly M, Hascoët MC, Colombel P, Bourin JM, 2002. Relationship between cerebral pharmacokinetics and anxiolytic activity of diazepam and its active metabolites after a single intra-peritoneal administration of diazepam in mice. *Hum Psychopharmacol* 17 (5), 239–245.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA, 2001. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14, 1143–1152.
- Delattre J, Beaudeau JL, Bonnefont-Rousselot D, 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Éditions médicales internationales.
- Demarque D, Jouanny J, Poitevin B, Sainy-Jean Y, 1995. Pharmacologie et matière médicale homéopathique (2nd edition ed.), Boiron, C.E.DH, France.
- Dhabhar FS, 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific, cell-mediated immunity: The role of hormones and leukocyte trafficking. Doctoral Dissertation, Laboratory of Neuroendocrinology, The Rockefeller University, New York.
- Dhabhar FS, 1997. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. In McCann SM, Lipton JM, Sternberg EM et al. (Eds.), *Neuroimmunomodulation: Molecular, Integrative Systems, and Clinical Advances*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 840. New York Acad. Sci.: New York.
- Dhabhar FS, McEwen BS, 1996. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol* 156, 2608–2615.
- Dhabhar FS, Miller AH, McEwen BS, Spencer RL, 1995. Effects of stress on immune cell distribution-dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 154, 5511–5527.

- Dhabhar FS, Miller AH, Stein M, McEwen BS, Spencer RL, 1994. Diurnal and stress induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain Behav Immun* 8, 66–79.
- Ditzen C, Jastorff AM, Keßler MS, Bunck M, Teplytska L, Erhardt A, Krömer SA, Varadarajulu J, Targosz BS, Sayan-Ayata EF, Holsboer F, Landgraf R, Turck CW, 2006. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Mol Cell Proteomics* 5, 1914–1920.
- Eisenberg DM, Davis RB, Ettner SL, Appel S, Wilkey S, Van Rompay M, Kessler RC, 1998. Trends in alternative medicine use in the United States, 1990–1997: results of a follow-up national survey. *J A M A* 280, 1569–1575.
- Endler NS, 1997. Stress, anxiety and coping : the multidemensional interaction model. *Can Psychol* 38 (3), 136–153.
- Espinoca E, Chillet P, 2006. *Immunologie*. Ellipses Edition.
- Faerber L, Drechsler S, Ladenburger S, Gschaidmeier H, Fischer W, 2007. The neuronal 5-HT₃ receptor network after 20 years of research —Evolving concepts in management of pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 560, 1–8.
- Fei GZ, Sylvan SP, Yao GB, Hellstrom UB, 1999. Quantitative monitoring of serum hepatitis B virus DNA and blood lymphocyte subsets during combined prednisolone and interferon-alpha therapy in patients with chronic hepatitis. *B J Viral Hepatitis* 6, 219–227.
- Finn DA, Rutledge-Gorman MT, Crabbe JC, 2003. Genetic animal models of anxiety. *Neurogenetics* 4, 109 –135.
- Floyd RA, 1997. Protective action of nitron-based free radical traps against oxidative damage to the central nervous system. *Adv Pharmacol* 38, 361–378.

- Frauke O, Arndt SS, van der Staay FJ, 2008. Pathological anxiety in animals. *The Veterinary Journal* 175 (1), 18-26.
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T, 2006. Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish Shellfish Immun* 20, 536-547.
- Gil L, Martinez G, González I, Tarinas A, Álvarez A, Giuliani A, Molina R, Tápanes R, Pérez J, León OS, 2003. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharm Res* 47, 217–224.
- Ginel PJ, Margario JM, Lucena R, Molleda JM, 1997. Concentrations of plasma immunoglobulins in the dog as determined by laser nephelometry. Comparison with radial immunodiffusion and enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35, 223–228.
- Gingrich JA, 2005. Oxidative stress is the new stress. *Nat Med* 11, 1281–1282.
- Goedken M, De Guise S, 2004. Flow cytometry as a tool to quantify oyster defence mechanisms. *Fish Shellfish Immun* 16, 539–52.
- Graeff FG, Zangrossi Jr H, 2002. Animal models of anxiety disorders. In: D'Haenen H, den Boer JA, Willner P, Editors, *Biological Psychiatry*, Wiley, Chichester, pp. 879–893.
- Graziani P, 2005. *Anxiété et troubles anxieux*. Armand Colin.
- Grenier-Boley V, 2001. «Le stress».
- Griebel G, Misslin R, Pawlowski M, Guardiola Lemaitre B, Guillaumet G, Bizot Espiard J, 1992. Anxiolytic-like effects of a selective 5-HT_{1A} agonist, S20244, and its enantiomers in mice. *Neuroreport* 3, 84-86.
- Gross C, Hen R, 2004. The developmental origins of anxiety. *Nat Rev Neurosci* 5, 545–552.

- Haller J, Bakos N, 2002. Stress-induced social avoidance: A new model of stress-induced anxiety? *Physiol Behav* 77 (2-3), 327-332.
- Halliwell B, 2006a. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97, 1634–1658.
- Halliwell B, 2006b. Phagocyte-derived reactive species: salvation 1 or suicide? *Trends Biochem Sci* 31, 509–515.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford.
- Hand WL, Hand DL, Vasquez Y, 2007. Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pr* 76, 44–50.
- Handley SL, 1995. 5-Hydroxytryptamine pathways in anxiety and its treatment. *Pharmacol Ther* 66, 103–148.
- Harman D, 1956. Aging : a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300.
- Harrison JF, Hollensworth SB, Spitz DR, Copeland WC, Wilson GL, LeDoux SP, 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucl Acid Res* 33, 14.
- Herbert TB, Cohen S, 1993. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review *Psychosom Med* 55, 364–379.
- Hodgkin PD, Rush J, Guett A, Bartell G, Hasbold J, 1998. The logic of intercellular communication in the immune system. *Fener Conference. Immunol cell Biol* 76, 448-453.
- Hohen-Saric R, McLeod DR, 2000. Anxiety and arousal: physiological changes and their perception. *J Affect Disorders* 61, 217–224.

- Hong H, Liu G, 2004. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sci* 74, 2959–2973.
- Hovatta L, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, Ellison JA, Schadt EE, Verma IM, Lockhart DJ, Barlow C, 2005. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662–666.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR, 2002. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol Biochem Be* 71, 533–554.
- Iverson SD, 1984. 5-HT and anxiety. *Neuropharmacology* 23, 1553-1560.
- Jones BJ, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ, Oakley NR, Tyers MB, 1988. The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT₃-receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 93 (4), 985–993.
- Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T, leeuwenburgh C, 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *Faseb J* 2622–2642.
- Kahawara H, Yoshida M, Yokoo H, Nishi M, Tanaka M, 1993. Psychological stress increases serotonin release in the rat amygdala and prefrontal cortex assessed by in vivo microdialysis. *Neurosci Lett* 162, 81–84.
- Kaminogawa S, 1996. Food allergy, oral tolerance and immunomodulation-Their molecular and cellular mechanisms. *BioSci Biotech Bioch* 60, 1749-1756.
- Katalinic V, Milos M, Kulisic T, Jukic M, 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chem* 94, 550–557.
- Kerr MA, 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem J* 271, 285-296.
- Kettle CJ, Cheetham SC, Martin KF, Prow MR, Heal DJ, 1999. The effects of the peptide-coupling agent, EEDQ, on 5-HT_{2A} receptor binding and function in rat frontal cortex. *Neuropharmacology* 38, 1421–1430.

- Khakoo SI, Soni PN, Savage K, Brown D, Dhillon AP, Poulter LW, Dusheiko GM, 1997. Lymphocyte and macrophage phenotypes in chronic hepatitis C infection. Correlation with disease activity. *Am J Pathol* 150, 963–970.
- Kidd P, 2003. Th1/Th2 balance: The hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 8, 223-246.
- Knobelman DA, Kung HF, Lucki I, 2000. Regulation of extracellular concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in mouse striatum by 5-HT1A and 5-HT1B receptors. *Pharmacol Exp Ther* 292, 1111–1117.
- Kowalska MG, Kowalska H, Zawadzka-Glos L, Dębska M, Szerszeń E, Chmielik M, Wąsik M, 2003. Dysfunction of peripheral blood granulocyte oxidative metabolism in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Int J Pediatr Otorhi* 67, 365–371.
- Kril MP, Apuzzo ML, 1983. Observations in the study of T-lymphocyte subsets by monoclonal antibodies and flow cytometric analysis in intracranial neoplastic disorders. *Clin Neurosurg* 30, 125–36.
- Krömer SA, Keßler MS, Milfay D, Birg IN, Bunck M, Czibere L, Panhuysen M, Pütz B, Deussing JM, Holsboer F, Landgraf R, Turck CW, 2005. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J Neurosci* 25, 4375–4384.
- Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B, 2002a. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive–compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 46, 27–32.
- Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Ustundag B, Bulut S, 2002b. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 46, 186–189.

- Lader M, 1980. The psychophysiology of anxiety. In: van Praag HM, Lader MH, Rafaelsen UJ, Sachar EJ, editors. Handbook of biological psychiatry pt. 2. New York: Marcel Dekker; p. 225–47.
- Lanzenberger RR, Mitterhauser M, Spindelegger C, Wadsak W, Klein N, Mien LK, Holik A, Attarbaschi T, Mossaheb N, Sacher J, Geiss-Granadia T, Kletter K, Kasper S, Tauscher J, 2007. Reduced serotonin-1A receptor binding in social anxiety disorder. *Biol Psychiatry* 61, 1081–1089.
- Lê AD, Quan B, Juzystch W, Fletcher PJ, Joharchi N, Shaham Y, 1998. Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology* 135, 169-174.
- Leman S, Le Guisquet A, Belzung C, 2004. Liens anxiété-mémoire: études expérimentales. Dans : « Anxiété, anxiolytiques et troubles cognitifs », Editeur Ferreri, M., Elsevier, Paris, pp. 71-79.
- Lepicard EM, Joubert C, Hagneau I., Perez-Diaz F, Chapouthier G, 2000. Differences in anxiety-related behavior and response to diazepam in BALB/cByJ and C57BL/6J strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 739–748.
- Levy SM, Herberman RB, Lee J, Whiteside T, Beadle M, Heiden L, Simons A, 1991. Persistently low natural killer cell activity, age, and environmental stress as predictors of infectious morbidity. *Nat Immun Cell Growth Regul* 10, 289–307.
- Levy SM, Herberman RB, Simons A, Whiteside T, Lee J, McDonald R, Beadle M, 1989. Persistently low natural killer cell activity in normal adults: immunological, hormonal and mood correlates. *Nat Immun Cell Growth Regul* 8, 173–186.
- Lister RG, 1990. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 46, 321-340.

- Livesey PJ, 1986. *Learning and Emotion: A Biological Synthesis*, Lawrence Erlbaum, Hillsdale, NJ.
- Lucey DR, Clerici M, Shearer GM, 1996. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* 9, 532–562.
- Madrigal JL, Caso JR, de Cristobal J, Cardenas A, Leza JC, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA, 2003. Effect of subacute and chronic immobilisation stress on the outcome of permanent focal cerebral ischaemia in rats. *Brain Res* 979, 137–145.
- Madrigal JL, Olivenza R, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Rodriogo J, Leza JC, 2001. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24, 420–429.
- Mahaley MS, Brooks WH, Roszman TL, Bigner DD, Dudka L, Richardson S, 1977. Immunobiology of primary intracranial tumors. Part I: Studies of the cellular and humoral general immune competence of brain-tumor patients. *J Neurosurg* 46, 467–76.
- McCormick DA, Bal T, 1997. Sleep and arousal: thalamocortical mechanisms. *Annu Rev Neurosci* 20, 185–215.
- McGuirk P, Mills KHG, 2002. Pathogen-specific regulatory T cells provoke a shift in the Th1/Th2 paradigm in immunity to infectious diseases. *Trends Immunol* 23, 450-455.
- McHeyzer-Williams LJ, McHeyzer-Williams MG, 2005. Antigen specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.
- Meneses A, Perez-Garcia G, 2007. 5-HT_{1A} receptors and memory. *Neurosc Biobehav R* 31 (5), 705–727.
- Metzger H, 1970. Structure and function of gamma M macroglobulins. *Adv Immunol* 12, 57-116.

- Michel TM, Frangou S, Thiemeyer D, Camara S, Jecel J, Nara K, Brunklaus A, Zoechling R, Riederer P, 2007. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiat Res* 151, 145–150.
- Misslin R, Belzung C, Vogel E, 1989. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav Process* 18, 119–132.
- Misslin R, Griebel G, Saffroy-Spittler M, Vogel E, 1990. Anxiolytic and sedative effects of 5-HT_{1A} ligands, 8-OH-DPAT and MDL 73005EF, in mice. *Neuro Report* 1, 267-270.
- Mizoguchi K, Yuzurihara M, Ishige A, Sasaki H, Chui DH, Tabira T, 2001. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrino* 26, 443–459.
- Monteleone I, Vavassori P, Biancone L, Monteleone G, Pallone F, 2002. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. *Gut* 50, 60-64.
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ, 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *Faseb J* 18, 1791–1800.
- Morale MC, Serra PA, L'Episcopo F, Tirolo C, Caniglia S, Testa N, Gennuso F, Giaquinta G., Rocchitta G, Desole MS, Miele E, Marchetti B, 2006. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: Glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138, 869–878.
- Mosley RL, Benner EJ, Kadiu I, Thomas M, Boska MD, Hasan K, Laurie C, Gendelman HE, 2006. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin Neurosci Res* 6, 261–281.
- Muller CP, Carey RJ, Huston JP, De Souza Silva MA, 2007. Serotonin and psychostimulant addiction: Focus on 5-HT_{1A}-receptors. *Prog Neurobiol* 81, 133–178.
- Myou S, Fujimura M, Yasui M, Ueno T, Matsuda T, 1993. Bronchoalveolar lavage cell analysis in measles viral pneumonia. *Eur Respir J* 6, 1437– 1442.

- Nakano Y, 2004. Stress-induced modulation of skin immune function: two types of antigen-presenting cells in the epidermis are differentially regulated by chronic stress. *Br J Dermatol* 151, 50–64.
- Ng F, Berk M, Dean O, Bush AI, 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychoph* 21, 1–26.
- O'Brien JS, Sampson EL, 1965. Fatty acid and fatty aldehyde composition of the major brain lipids in normal human grey matter, white matter, and myelin. *J Lipid Res* 6 (4), 545-551.
- O'Sullivan S, Cormican L, Faul JL, Ichinohe S, Johnston SL, Burke CM, Poulter LW, 2001. Activated, cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes contribute to the pathology of asthma death. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 560–564.
- Oberbaum M, Cambar J, 1994. Hormesis: dose-dependent reverse effects of low and very low doses. in: Endler PC, Schulte J editors. *Ultra High Dilution, Physiology and Physics*. London: Kluwer Academic Publishers, 5–18.
- Öhman A, 2000. Anxiety. *Encyclopedia of stress* 1: 226-231. George Fink, Academic press. USA.
- Oja SS, Korpi ER, Saransaari P, 1990. Modification of chloride flux across brain membranes by inhibitory amino acids in developing and adult mice. *Neurochem Res* 15, 797-804.
- Ollier William ER, 2004. Cytokine genes and disease susceptibility. *Cytokine* 28, 174-178.
- Padovan CM, Guimarães FS, 2000. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. *Braz J Med Biol Res* 33, 79-83.
- Pak JH, Kim T, Kim MJ, Kim JY, Choi H, Kim SA, Tchah H, 2006. Reduced expression of 1-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. *Exp. Eye Res* 82, 899–906.
- Pastoret PP, 1990. Govaerts A, Bazin H. *Immunologie animale. Medecine-sciences*. Flammarion.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30(9), e36.
- Pham BN, Mosnier JF, Walker F, Njapoum C, Bougy F, Degott C, Erlinger S, Cohen JH, Degos F, 1994. Flow cytometry CD4+/CD8+ ratio of liver-derived lymphocytes correlates with viral replication in chronic hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 97, 403– 410.
- Pulendran B, 2004. Modulating Th1/Th2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunol Res* 29, 187-196.
- Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Hong YS, Kim DW, Kim CC, Kim HK, Kim TG, 2003. Polymorphisms of IL-1B, IL-1RN, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, and IFN-gamma genes in the Korean population. *Hum Immunol* 64, 979-989.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R, 2008a. Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice. *Brain Behav Immun* doi: 10.1016/j.bbi.2008.06.005.
- Rammal H, Bouayed J, Younos C, Soulimani R, 2008b. The impact of high anxiety levels on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. *Eur J Pharmacol* 589 (1-3), 173-175.
- Ransom BR, 2000. Glial modulation of neural excitability mediated by extracellular pH: a hypothesis revisited. *Prog brain Res* 125, 217-228.
- Rapado A, Lopez Gavilanes E, Palomino P, Yague M, de la Piedra C, Diaz Curiel M, Ortiz F, 1994. Differences in the cellular response of the immune system in patients with Paget's disease of bone after elcatonin and etidronate administration. *Rev Clin Esp* 194, 970– 973.

- Raps SP, Lai JCK, Hertz L, Cooper AJL, 1989. Glutathione is present in the high concentrations in cultured astrocytes, but not in cultured neurons. *Brain Res* 493, 398–401.
- Reinhart E, 1998. Hormesis und die Bewertung kleinster Dosen von Wirkstoffen. *Biol Med* 27, 51–54.
- Rinaldi M., Moroni P, Paape MJ, Bannerman DD, 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Vet Immunol Immunopathol* 115, 107–125.
- Rook GA, Brunet LR, 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 54, 317- 20.
- Roszman TL, Brooks WH, 1980. Immunobiology of intracranial tumors. Part III. Demonstration of a qualitative lymphocyte abnormality in patients with primary brain tumors. *Clin Exp Immunol* 39, 395–402.
- Rota C, Chignell CF, Mason R, 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. *Free Radical Biol Med* 27, 873–881.
- Sakai Y, Izumi N, Marumo F, Sato C, 1993. Quantitative immunohistochemical analysis of lymphocyte subsets in alcoholic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 8, 39–43.
- Salem ML, 2005. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *Int Immunopharmacol* 5, 1749–1770.
- Schmitz C, Rhodes ME, Bludau M, Kaplan S, Ong P, Ueffing I, Vehoff J, Korr H, Frye CA, 2002. Depression: reduced number of granule cells in the hippocampus of female, but not male, rats due to prenatal restraint stress. *Mol Psychiatr* 7, 810–813.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, 1987. Sequence and functional expression of

- the GABA(A) receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328, 221–227.
- Seegerstrom SC, Miller GE, 2004. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 130, 601–630.
- Selye H, 1936. A syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature* 138, 32.
- Servatius RJ, Salameh G, Goyle KM, Pare WP, 2000. Restraint Stress, *Encyclopaedia of Stress*. George Fink, vol. 3. Academic Press, USA, pp. 376–377.
- Shaham Y, Erb S, Stewart J, 2000. Stress-induced relapse to heroin and cocaine seeking in rats. A review. *Brain Res Rev* 33, 13-33.
- Shapiro HM, 2003. *Practical Flow Cytometry*, Willey J & Sons, eds.
- Sharma R, Herndon B, Dew M, Rosa U, 1997. Survival benefits of pulmonary cellular activation in AIDS patients with *Pneumocystis* infection. *South Med J* 90, 531– 534.
- Shen HM, Shi CY, Shen YI, Ong CN, 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biol Med* 21, 139–146.
- Simonian NA, Coyle JT, 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Rev of Pharmacol* 36, 83–106.
- Sinha R, Catapano D, O'Mally S, 1999. Stress-induced craving and stress responses in cocaine dependent individuals. *Psychopharmacology* 142, 343-351.
- Smythe JW, Murphy D, Bhatnagar S, Timothy C, Costall B, 1996. Muscarinic antagonists are anxiogenic in rats tested in the black-white box. *Pharmacol Biochem Behav* 54, 57–63.
- Sokoloff L, 1991. Relationship between functional activity and energy metabolism in the nervous system: whether, where and why? In *Brain work and mental activity*. Lassen NA, Ingvar DH, Raichle ME, Friberg L, eds (Munksgaard: Copenhagen), 52-64.

- Sood S, Narang D, Thomas MK, Gupta YK, Maulik SK, 2006. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on cardiac changes in rats subjected to chronic restraint stress. *J Ethnopharmacol* 108, 423–427.
- Spielberger CD, Gorsuch RL, Lushene RE, 1970. The State-trait Anxiety Inventory (STAI) test manual form X. Consulting Psychologists Press, Palo Alto, CA.
- Splettstoesser WD, Schuff-Werner P, 2002. Oxidative stress in phagocytes-“The enemy within”. *Microsc Res Techniq* 57, 441–445.
- Stephoe A, 2000. Stress effects, overview. *Encyclopedia of stress* 3, 510-411. George Fink, Academic press. USA.
- Stöhr T, Almeida OFX, Landgraf R, Shppenberg TS, Hofboer F, Spanagel R, 1999. Stress and corticosteroid-induced modulation of locomotor response rats. *Brain Res* 103, 85–93.
- Sullivan GM, Coplan JD, Kent JM, Gorman JM, 1999. The noradrenergic system in pathological anxiety: A focus on panic with relevance to generalized anxiety and phobias. *Biol Psychiatry* 46, 1205–1218.
- Szuster-Ciesielska A, Słotwińska M, Stachura A, Marmurowska-Michałowska H, Dubas-Ślemp H, Bojarska-Junak A, Kandefler-Szerszeń M, 2008. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog Neuro-Psychoph* 32, 686–694.
- Tanaka M, Yoshida M, Emoto H, Ishii H, 2000. Noradrenaline system in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *Eur J Pharmacol* 405, 397–406.
- Thornalley PJ, 2006. Unease on the role of glyoxalase 1 in high-anxiety-related behaviour. *Trends Mol Med* 12, 195–199.

- Tobler I, Kopp C, Deboer T, Rudolph U, 2001. Diazepam-induced changes in sleep: role of the alpha 1 GABA(A) receptor subtype. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 6464–6469.
- Townsend MJ, McKenzie AN, 2000. Unravelling the net ? cytokines and diseases. *J Cell Sci* 113, 3549-3550.
- Traber J, Glaser T, 1987. 5-HT1A receptor-related anxiolytics. *Trends Pharmac Sci* 8, 432–437.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J, 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B* 39, 44–84.
- Valnet J, 1992. *Phytothérapie* (6th edition ed.), Maloine, Paris.
- van Dijken HH, Mos J, van der Heyden JA, Tilders FJ, 1992. Characterization of stress-induced long-term behavioural changes in rats: Evidence in favor of anxiety. *Physiol Behav* 52 (5), 945-951.
- van Raaij MT, Oortgiesen M, Timmerman HH, Dobbe CJ, Van Loveren H, 1996. Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiol Behav* 60, 1527–1533.
- Vautrin S, Pelloux Y, Costentin J, 2005. Preference for caffeine appears earlier in non-anxious than in anxious mice. *Neurosci Lett* 386, 94–98.
- Vignes M, Maurice T, Lanté F, Nedjar M, Thethi K, Guiramand J, Récasens M, 2006. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res* 1110, 102–115.
- Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J, De la Fuente M, 2007. A model of premature aging in mice based on altered stress-related behavioral response and immunosenescence. *Neuroimmunomodulat* 14, 157–162.

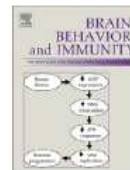
- Wang Q, Yang X, Zhang B, Yang X, Wang K, 2007. The anxiolytic effect of cinnabar involves changes of serotonin levels. *Eur J Pharmacol* 565, 132–137.
- Weiss SM, Lightowler S, Stanhope KJ, Kennett GA, Dourish CT, 2000. Measurement of anxiety in transgenic mice. *Rev Neurosci* 11, 59– 74.
- Whittington MA, Traub RD, Jefferys JG, 1995. Synchronized oscillations in interneuron networks driven by metabotropic glutamate receptor activation. *Nature* 373, 612–615.
- Wrona D, 2006. Neural–immune interaction: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol* 172, 38–58.
- Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J, 2002. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* 39, 777–780.
- Yin W, Deng XK, Yin FZ, Zhang XC, Cai BC, 2007. The cytotoxicity induced by brucine from the seed of *Strychnos nux-vomica* proceeds via apoptosis and is mediated by cyclooxygenase 2 and caspase 3 in SMMC 7221 cells. *Food Chem Toxicol* 45 (9), 1700–1708.
- Young R, Johnson DN, 1991. A fully automated light/dark apparatus useful for comparing anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 40, 739–743.
- Zollman C, Vickers A, 1999. ABC of complementary medicine: what is complementary medicine. *BMJ* 319, 693–696.

PUBLICATIONS



Contents lists available at ScienceDirect

Brain, Behavior, and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi

Short Communication

Evidence that oxidative stress is linked to anxiety-related behaviour in mice

Hassan Rammal, Jaouad Bouayed*, Chafique Younos, Rachid Soulimani*

Anxiété, Stress Oxydant et Bioactivité (URAFPA/INRA), Université P. Veraine-Metz, Briedoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2008

Received in revised form 16 June 2008

Accepted 17 June 2008

Available online xxx

Keywords:

Anxiety

Anxious mice

Non-anxious mice

Oxidative stress

Oxidative status

ROS

ABSTRACT

Oxidative stress in central and peripheral systems is involved in many diseases, including cancer, cardiovascular diseases, neurodegenerative diseases and several psychiatric disorders. In the present study, the brain and peripheral oxidative status of non-anxious and anxious mice was evaluated using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a sensor of reactive oxygen species (ROS). Here we report that anxiety levels are linked to the oxidative status in both neuronal and glial cells in the cerebellum and hippocampus, in neurons of the cerebral cortex and in peripheral leucocytes (monocytes, granulocytes and lymphocytes), revealing the presence of oxidative stress in the central and peripheral systems of anxious mice. These findings suggest the redox system in anxious mice may play a role in neuroinflammation and neurodegeneration, predisposing them to recurrent infections and chronic inflammation.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The brain is particularly vulnerable to oxidative stress for several reasons. Among these reasons are the brain's high O₂ consumption, its modest antioxidant defences and its lipid-rich constitution (Ng et al., 2008; Halliwell, 2006a). There is evidence that oxidative stress is involved in many diseases, including cancer, neurodegenerative diseases and many psychiatric problems (Ng et al., 2008; Valko et al., 2007; Halliwell, 2006a; Kuloğlu et al., 2002a,b). The link between oxidative stress and levels of anxiety has also been postulated. We have previously reported linear relationships between peripheral blood oxidative stress markers and anxiety behaviours in mice (Bouayed et al., 2007b). These findings supported previous reports that showed a close relationship between brain oxidative stress markers and anxiety-related phenotypes in six inbred mouse strains (Hovatta et al., 2005). The relationship between extreme trait anxiety and central oxidative status is more complex, given that glyoxalase 1 is expressed at higher levels in low anxiety mice compared with anxious mice (Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). This contrasting evidence may be related to the differences in the animal models used (Thornalley, 2006). In the present investigation, we compared the brain and peripheral oxidative status of mice with contrasting levels of anxiety in the same strain, contrary to previous studies (Hovatta et al., 2005; Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). Indeed, using DCFH-DA, a tracer of ROS (Carini

et al., 2000; Rota et al., 1999; Shen et al., 1996), we comparatively evaluated the intracellular ROS accumulation in neuronal and glial cells of three brain tissues (cerebral cortex, cerebellum and hippocampus) and in peripheral blood cells (granulocytes, lymphocytes and monocytes) in mice with extreme anxiety.

The light/dark choice test (Crawley and Goodwin, 1980; Crawley, 1981; Misslin et al., 1989; Belzung and Le Pape, 1994; Bourin and Hascoet, 2003) was used to differentiate between anxious and non-anxious mice from the same population of Swiss albino male mice (OF1).

2. Materials and methods

2.1. Animals

We used Swiss albino male mice (OF1), 9-weeks-old at the time of reception from the breeder (Charles River, France) ranging in weight from 35 to 40 g. The animals were housed with a 12-h light: 12-h dark schedule (lights on at 8:00 pm) with free access to water and food (SDS Dietex, France) and maintained at a constant temperature (21 ± 2 °C) and a relative humidity of 55 ± 10%. Experiments began after a 1-week period of acclimatization.

2.2. Behavioural study

2.2.1. Apparatus

The light/dark box apparatus consisted of two compartments (light/dark, surface ratio 3:2), divided into 15 squares (9 × 9 cm). The dark box (black PVC, 27 × 18 × 29 cm) was illuminated by a dim red light (50 Lux) and was divided into six squares. The lit

* Corresponding authors. Fax: +33 387378506 (J. Bouayed); fax: +33 387378504 (R. Soulimani).

E-mail addresses: bouayedj@yahoo.fr (J. Bouayed), soulimani@univ-metz.fr (R. Soulimani).

box (white PVC, 27 × 27 × 29 cm) was illuminated by a white light located 1.50 m above the device (150 Lux at the level of the floor) and was divided into nine squares. The two compartments were accessible by means of a small door (7 × 7 cm). All animal procedures were carried out in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.2.2. Procedure

All behavioural tests were carried out as previously described (Bouayed et al., 2007b). Briefly, testing was performed in a dark room. After each test, the light/dark box was cleaned with a 10% ethanol solution. Each test was 180 s long. At the beginning of the test, each animal was placed in the lit box with its head facing the door of the dark box. The amount of time spent in the lit box, the number of entries into the lit box (all four feet) and the latency time (latency of the first crossing from the dark to the lit box) were recorded after the first entry into the dark box.

The mice were considered anxious when the latency time was elevated (more than 120 s), the time spent in the lit box was low (from 0 to 14 s) and the number of transitions was weak (from 0 to 2). The mice were considered non-anxious when the latency time was low (from 5 to 30 s), the time spent in the lit box was elevated (from 70 to 100 s) and the number of transitions was high (from 8 to 12 s).

According to these criteria, only 10% of mice were considered as anxious ($n = 10$) and 10% as non-anxious ($n = 10$) from a general population of 100 mice. Thus, 80% of mice with intermediate behaviour were eliminated in this study.

2.3. Evaluation of ROS levels

2.3.1. Apparatus

Prominin-1, which is expressed in neural stem cells, was used to magnetically separate neurons and glial cells from other cells in the mouse brain using Anti-Prominin-1 Microbeads in the MACS[®] Column Separator (MINIMACS MS column) (Miltenyi Biotec, France). The magnetically labelled prominin-1⁺ cells were retained on the column. After the collection of neurons and glial cells, they were marked using CD90-PE and CD11b-FITC antibodies, respectively, to be analyzed using flow cytometry.

A flow cytometer (FACScan, Becton-Dickinson, Immunofluorometry Systems, France) was used to evaluate the level of intracellular ROS in all cell types by monitoring their emitted fluorescence (Bouayed et al., 2007b).

2.3.2. ROS evaluations in neurons and glial cells

Anxious and non-anxious mice were killed by decapitation 24 h after behavioural test. The skull was opened and the brain was removed on cold ice. After removal of the meninges, the cerebellum, cerebral cortex and hippocampus were collected. The following protocol was performed according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, France). Isolated samples were collected in separate tubes containing 1 × PBS and transferred for tissue digestion into separate tubes containing 0.2% collagenase II for 30 min (Invitrogen). The isolated samples were digested at room temperature for 30 min. Following digestion, supernatants containing collagenase II were carefully removed. Buffer solution (2 ml; 1 × PBS plus EDTA 2 mM and BSA 0.5%) was then added, and a filtration step was done using a microfilter (30 μm). The filtrates were centrifuged (894 × g, 10 min and 4 °C) and the supernatants were completely removed, after which 2 ml of the buffer solution were added. Samples were then centrifuged (894 × g, 10 min and 4 °C) and the supernatants were completely removed. Cell pellets were re-suspended in 80 μl of buffer per 10⁷ total cells and 20 μl of Anti-Prominin-1 Microbeads were added. Samples were well mixed and then they were incubated at 4–8 °C for 15 min. Cells were

then washed by adding 1–2 ml of buffer and centrifuged (894 × g, 10 min and 4 °C). The supernatants were pipetted off completely and cells were re-suspended in 500 μl of buffer. We proceeded to magnetically separate the cells using an appropriate MINIMACS MS Column. The eluted cells were then centrifuged (894 × g, 10 min and 4 °C), the supernatants were completely removed and the cell pellets were re-suspended in 80 μl of buffer, 10 μl of antibody to CD90-PE and 10 μl of antibody to CD11b-FITC. They were then incubated at 4–8 °C for 10 min, after which 1 ml of buffer was added and a centrifugation step under the same conditions was done. The supernatants were completely removed. The cells were re-suspended in 1 ml of buffer plus 5 μl of DCFH-DA (50 μM), mixed and incubated at 37 °C for 15 min (Bouayed et al., 2007b). As soon as the incubation was completed, the samples were placed on ice for 5 min to stop the reaction. The ROS levels were measured for each mouse using the flow cytometry technique (Bouayed et al., 2007b). Oxidation of the intracellular oxidation-sensitive probe results in an increased mean fluorescent intensity (MFI: % positive cells multiplied by the mean channel of fluorescence intensity of the positive peak) (Harrison et al., 2005).

2.3.3. ROS evaluations in lymphocytes, granulocytes and monocytes

The preparation of blood has been carried out as previously described (Bouayed et al., 2007b). Flow cytometry allowed the morphological identification of peripheral blood granulocytes, monocytes and lymphocytes in relation to their relative size and complexity (relative granularity). The intracellular ROS levels in the immune cells of each mouse were measured using DCFH-DA assay (Bouayed et al., 2007b). Oxidation of the intracellular oxidation-sensitive probe results in an increased mean fluorescent intensity (MFI) (Harrison et al., 2005).

3. Statistical analyses

Results are presented as means ± SEM. Data were analyzed by a Student's *t*-test. Statistical evaluation was done with Statview[®] 4.5 software (Abacus concepts Inc.). Mean differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

4. Results

A Student's *t*-test revealed significant differences between anxious and non-anxious mice with respect to their oxidative status in both neuronal and glial cells of two brain tissues (cerebellum and hippocampus; $p < 0.05$) and in neurons of cerebral cortex ($p < 0.05$) (Table 1). No significant difference was found between anxious and non-anxious mice in the intracellular redox status of the glial cells of the cerebral cortex ($p > 0.05$, Table 1). There were also significant differences between anxious and non-anxious mice with respect to their levels of the intracellular ROS accumulation in peripheral leucocytes (granulocytes, monocytes and lymphocytes) ($p < 0.05$, Table 1).

5. Discussion

Mice with different extremes of anxiety have been used in several studies in order to have a better insight on anxiety (Vautrin et al., 2005; Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). We have previously reported that naive Swiss albino male mice show a large heterogeneity in their anxiety levels (Bouayed et al., 2007b). In the present investigation, mice in this strain with contrasting levels of anxiety have been selected to evaluate their brain and peripheral oxidative status in an unbiased manner. Our selection criteria were rather strict, as only 10% were considered as anxious and 10% as non-anxious from a general population of 100 mice. In other study (results not shown), we have found using the light/dark box

Table 1
Intracellular ROS accumulation in cerebral and peripheral cells of anxious and non-anxious mice

Type of cells	Mean fluorescent intensity (arbitrary units)	
	Anxious mice	Non-anxious mice
Neurons of cerebral cortex	1223 ± 232**	177 ± 76
Neurons of cerebellum	546 ± 128*	227 ± 41
Neurons of hippocampus	1749 ± 566*	227 ± 51
Glial cells of cerebral cortex	429 ± 48	310 ± 72
Glial cells of cerebellum	343 ± 36*	195 ± 31
Glial cells of hippocampus	468 ± 43*	319 ± 29
Lymphocytes	251 ± 46*	152 ± 11
Monocytes	56 ± 9*	35 ± 2.5
Granulocytes	1979 ± 405**	448 ± 77

The mean fluorescent intensity corresponds to fluorescence resulting from intracellular DCFH-DA oxidation by intracellular ROS. Data are expressed as means ± SEM (n = 10). *p < 0.05; **p < 0.01.

test that anxious and non-anxious mice do not change their status of anxiety according to time (during a period of 15 days). Consequently, we considered the anxiety observed to be a trait anxiety, since it is invariable, despite the fact that the paradigm used is more appropriate to evaluate state anxiety (Misslin et al., 1989; Belzung and Le Pape, 1994).

The well known sensor of ROS, the tracer DCFH-DA, has been used previously to evaluate the intracellular redox status of cells (Carini et al., 2000; Rota et al., 1999; Shen et al., 1996; Bouayed et al., 2007b). Levels of ROS can be directly evaluated by sensors such as DCFH-DA (Carini et al., 2000; Rota et al., 1999) or indirectly by measurement of certain antioxidant enzyme levels, by products of lipid peroxidation or by levels of some transition metals such as copper, zinc and iron (Kuloglu et al., 2002a, 2002b). We have found that the different cell types studied in anxious mice have a strong accumulation of intracellular ROS in comparison to non-anxious mice, suggesting that oxidative stress is present in the cerebral and peripheral systems of anxious mice. Significant differences have been found between anxious and non-anxious mice with respect to their oxidative status in both neuronal and glial cells of two brain tissues (cerebellum and hippocampus), in neurons of cerebral cortex and in some peripheral blood cells (monocytes, granulocytes and lymphocytes). We have also found that oxidative stress in hippocampus of anxious mice was more pronounced in neurons than in glial cells, as the intensity of fluorescence resulting from intracellular DCFH-DA oxidation by intracellular ROS in neurons was approximately 4-fold higher than in glial cells. Additionally, the oxidative stress in the cerebral cortex of anxious mice was present only in neurons. These observations could be explained by the fact that glial cells possess an antioxidative system defence stronger than neurons due to the higher concentrations of antioxidant enzymes present (Raps et al., 1989).

Glial cells play a key role in the protection of the nervous system by detoxifying ROS released by neurons and acting as debris scavengers and killers of microbial pathogens (Mosley et al., 2006; Morale et al., 2006). The presence of oxidative stress in glial cells of cerebellum and hippocampus of anxious mice therefore may alter their protective function. It is widely accepted that oxidative stress is implicated as a major cause of neuronal injury in a wide range of neurological diseases, and that the signalling between neurons and glial cells during neuronal injury incite inflammatory responses (Morale et al., 2006). These findings support that anxious mice might be prone to neuroinflammation and neurodegeneration.

Anxiety most likely becomes pathological when it presents an extreme and persistent character (Vautrin et al., 2005). Oxidative stress mechanisms have been implicated in the pathogenesis of many psychiatric disorders, including some anxiety disorders (Ng et al., 2008; Kuloglu et al., 2002a,b). This hypothesis has theoret-

ical appeal, as the brain is considered particularly vulnerable to oxidative damage (Ng et al., 2008; Halliwell, 2006a). The presence of oxidative stress in the brain of anxious mice is therefore deleterious and could lead to pathological anxiety or other diseases linked to the toxic effects of ROS. The imbalance of the redox system of cells in favour of uncontrolled oxidants production (ROS) was also found in peripheral blood leucocytes of anxious mice. It is well known that oxidative stress rapidly inactivates the phagocytic and bactericidal properties of phagocytes (Spletstoeser and Schuff-Werner, 2002; Halliwell, 2006b). Granulocytes play an important role in inducing the non-specific immune response and participate in protecting the body from harmful microorganisms (Kowalska et al., 2003). The dysfunction of oxidative metabolism of granulocytes that is observed in several pathologies is the primary cause of the alteration of vital functions of these phagocytes, increasing infection and chronic inflammation risks (Yasunari et al., 2002; Kowalska et al., 2003; Hand et al., 2007). Anxious mice could therefore be more predisposed to infections and chronic inflammation than those that are non-anxious. The role of the particular types of lymphocytes in the elimination of pathogens, cancerous cells and infected cells has also been shown (Espinoca and Chillet, 2006). Oxidative stress in lymphocytes aggravates the state of immune status in anxious mice, favouring an increase of recurrent infection and cancer.

In general, antioxidative defence mechanisms are the same in all cell types (Spletstoeser and Schuff-Werner, 2002). Enzymatic and non-enzymatic antioxidants constitute the antioxidative defence systems of cells. Some non-enzymatic antioxidants such as polyphenols, the major class of exogenous antioxidants, derive only from diet (Ratnam et al., 2006). Interestingly, some dietary polyphenols have two effects, one that is cytoprotective and the other anxiolytic (Bouayed et al., 2007a; Vignes et al., 2006). These dietary antioxidants could therefore be beneficial to anxious subjects.

References

- Belzung, C., Le Pape, G., 1994. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56, 623–628.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, A., Younos, C., Soulimani, R., 2007a. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J. Neurol. Sci.* 262, 77–84.
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Soulimani, R., 2007b. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 564, 146–149.
- Bouin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 55–65.
- Carini, M., Giancarlo, A., Piccone, M., Facino, R.M., 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *II Farmaco* 55, 526–534.
- Crawley, J.N., 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 695–699.
- Crawley, J.N., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a single animal behaviour model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 167–170.
- Ditzen, C., Jastorff, A.M., Keßler, M.S., Bunck, M., Teplytska, L., Erhardt, A., Krömer, S.A., Varadarajulu, J., Targosz, B.S., Sayan-Ayata, E.F., Holsboer, F., Landgraf, Rainer, Turk, C.W., 2006. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1914–1920.
- Espinoca, E., Chillet, P., 2006. *Immunologie*, Ellipses Edition.
- Halliwell, B., 2006a. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658.
- Halliwell, B., 2006b. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31, 509–515.
- Hand, W.L., Hand, D.L., Vasquez, Y., 2007. Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 76, 44–50.
- Harrison, J.F., Hollensworth, S.B., Spitz, D.R., Copeland, W.C., Wilson, G.L., LeDoux, S.P., 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res.* 33, 33.
- Hovatta, L., Tennant, R.S., Helton, R., Marr, R.A., Singer, O., Redwine, J.M., Ellison, J.A., Schadt, E.E., Verma, I.M., Lockhart, D.J., Barlow, C., 2005. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662–666.
- Kowalska, M.G., Kowalska, H., Zawadzka-Glos, L., Dębska, M., Szerszeń, E., Chmielek, M., Wąsik, M., 2003. Dysfunction of peripheral blood granulocyte oxidative

- metabolism in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 67, 365–371.
- Krömer, S.A., Keßler, M.S., Milfay, D., Birg, I.N., Bunck, M., Czibere, L., Panhuysen, M., Pütz, B., Deussing, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Turck, C.W., 2005. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J. Neurosci.* 25 (17), 4375–4384.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Tunckol, H., Ustundag, B., 2002a. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 46, 27–32.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Ustundag, B., Bulut, S., 2002b. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 46, 186–189.
- Misslin, R., Belzung, C., Vogel, E., 1989. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav. Process.* 18, 119–132.
- Morale, M.C., Serra, P.A., L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Gennuso, F., Giaquinta, G., Rocchitta, G., Desole, M.S., Miele, E., Marchetti, B., 2006. Estrogen, neuroinflammation and neuroprotection in Parkinson's disease: glia dictates resistance versus vulnerability to neurodegeneration. *Neuroscience* 138, 869–878.
- Mosley, R.L., Benner, E.J., Kadiu, I., Thomas, M., Boska, M.D., Hasan, K., Laurie, C., Gendelman, H.E., 2006. Neuroinflammation, oxidative stress, and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Clin. Neurosci. Res.* 6, 261–281.
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I., 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1–26.
- Raps, S.P., Lai, J.C.K., Hertz, L., Cooper, A.J.L., 1989. Glutathione is present in the high concentrations in cultured astrocytes, but not in cultured neurons. *Brain Res.* 493, 398–401.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N.V.R., 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *J. Control. Release* 113, 189–207.
- Rota, C., Chignell, C.F., Mason, R., 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 873–881.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Shen, Y.J., Ong, C.N., 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 139–146.
- Spletstoeser, W.D., Schuff-Werner, P., 2002. Oxidative stress in phagocytes—"The enemy within". *Microsc. Res. Tech.* 57, 441–445.
- Thornalley, P.J., 2006. Unease on the role of glyoxalase 1 in high-anxiety-related behaviour. *Trends Mol. Med.* 12, 195–199.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84.
- Vautrin, S., Pelloux, Y., Costentin, J., 2005. Preference for caffeine appears earlier in non-anxious than in anxious mice. *Neurosci. Lett.* 386, 94–98.
- Vignes, M., Maurice, T., Lanté, F., Nedjar, M., Thethi, K., Guiramand, J., Récasens, M., 2006. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res.* 1110, 102–115.
- Yasunari, K., Maeda, K., Nakamura, M., Yoshikawa, J., 2002. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* 39, 777–780.



Short communication

The impact of high anxiety level on the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes

Hassan Rammal, Jaouad Bouayed, Chafique Younos, Rachid Soulimani*

Ethnobotanique et Pharmacologie, Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité. Université P. Verlaine Metz, BP 4102, 57040, Metz Cedex 01, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2008
 Received in revised form 3 June 2008
 Accepted 12 June 2008
 Available online 18 June 2008

Keywords:

Reactive oxygen species
 Lymphocyte
 Monocyte
 Granulocyte
 Light/dark test
 Anxiety

ABSTRACT

Anxiety has been implicated in a number of psychiatric disorders, such as generalized anxiety disorder, depression, panic attacks, phobias, obsessive-compulsive disorders and posttraumatic stress disorders. In this study, we investigated the impact of high anxiety on the levels of intracellular reactive oxygen species in lymphocytes, granulocytes and monocytes from the peripheral blood of mice by using a 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe. The behavioural light/dark choice test was used to distinguish highly anxious from less anxious mice. Our results showed that a high anxiety level significantly increased the generation of reactive oxygen species in the peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The production of excess reactive oxygen species, such as superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide and peroxynitrite anion (also classified as a reactive nitrogen specie), has been found to play many important roles in tissue damage and loss of function in a number of tissues and organs, and is believed to contribute to the pathogenesis of a variety of diseases (Simic et al., 1989; Halliwell, 2006). The balance between antioxidation and oxidation is critical in maintaining a healthy biological system. Oxidative stress is involved in many acute and chronic diseases including cancer, cardiovascular disorders and neurodegenerative diseases (Montuschi et al., 2004; Judge et al., 2005). The objective of the present study is to investigate the impact of high anxiety on the intracellular redox status of mouse lymphocytes, granulocytes and monocytes. The light/dark box choice test was used to estimate the level of anxiety in mice (Crawley and Goodwin, 1980; Misslin et al., 1989; Belzung and Le Pape, 1994). Flow cytometric analyses were carried out using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, a sensor of reactive oxygen species, to evaluate the oxidative status of mouse peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes (Rota et al., 1999; Carini et al., 2000; Bouayed et al., 2007a,b).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Naive males Swiss albino mice, 9 weeks old at the time of reception from the breeder (Charles River, France) ranging in weight from 30–40 g were used. Prior to experimental testing, they were housed in groups of five in standard cages containing a supply of food pellets (SDS Dietex France) and water available *ad libitum*. They were kept on a 12/12 h light/dark cycle (light on at 6:00 pm), temperature controlled condition (22±2 °C) and a relative humidity of 55±10%. All animal procedures were carried out in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.2. Light-dark box test

The light/dark box consisted of two PVC boxes (light/dark, surface ratio 2:3) divided into 15 squares: 9×9 cm. The dark box (black PVC, 27×18×29 cm) is illuminated by a dim red light (50 lx) and is divided into six squares. The lit box (white PVC, 27×27×29 cm) is illuminated by a white light located 1.50 m above the device (150 lx at the level of the floor) and is divided into 9 squares. The two compartments communicate by means of a small door (7×7 cm) to allow passage from one compartment to the other. All behavioural tests were carried out as previously described (Bouayed et al., 2007b). Briefly, testing was performed in a dark room. After each test, the light/dark box was cleaned with a 10% ethanol solution. Each test was 180 s long. At the

* Corresponding author. Tel./fax: +33 387378504.

E-mail address: soulimani@univ-metz.fr (R. Soulimani).

beginning of the test, each animal was placed in the lit box with its head facing the door of the dark box. The amount of time spent in the lit box, the number of entries into the lit box (all four feet) and the latency time (latency of the first crossing from the dark to the lit box) were recorded after the first entry into the dark box.

The mice were considered high anxious when the latency time was elevated (more than 120 s), the time spent in the lit box was low (from 0–14 s) and the number of transitions was weak (from 0–2). The mice were considered low anxious when the latency time was low (from 5–30 s), the time spent in the lit box was elevated (from 70–100 s) and the number of transitions was high (from 8–12).

According to these strict criteria, only 10% of mice were considered as high anxious ($n=10$) and 10% as low anxious ($n=10$) from a general population of 100 mice. Thus, 80% of mice with intermediate behaviour were eliminated in this study.

2.3. Measurement of reactive oxygen species levels

2.3.1. Apparatus

Flow cytometry is used to separate the different immune cell populations according to size (forward light scatter, FSC) and relative granularity (side light scatter, SSC). FSC and SSC were used after excitation of the immune cells with a 488 nm argon laser beam (Bouayed et al., 2007a,b). The level of intracellular reactive oxygen species was measured in lymphocytes, granulocytes and monocytes by monitoring the emitted fluorescence of these cells (FACS-Scan, Becton–Dickinson, Immunofluorometry Systems, France).

2.3.2. Procedure

Mice were anaesthetized with halothane and then sacrificed 24 h after the behavioural test. Blood was collected in heparinized tubes. Erythrolysis was carried out using 2 ml of lysis solution (BD Bioscience, France) in 100 μ l of blood from each mouse. The samples were then placed in the dark for 10 min. After centrifugation (447 \times g; 5 min; 4 °C), the supernatant was removed. Then, 2 ml of cellwash solution (BD Bioscience, France) was added to the sediment containing the white cells and mixed. A second centrifugation was carried out in the same conditions. The supernatant was again completely removed. 1 ml of HBSS buffer and 5 μ l of DCFH-DA (50 μ M) were added to the sediment (white cells) obtained by centrifugation, mixed and incubated in the dark for 15 min at 37 °C (Bouayed et al., 2007b). As soon as the incubation was completed, the samples were placed on ice for 5 min to stop the reaction. The levels of reactive oxygen species of each mouse were measured using flow cytometry. Oxidation of the intracellular oxidation-sensitive probe resulted in increased mean fluorescence intensity (percent positive cells multiplied by the mean channel of fluorescence intensity of the positive peak) (Harrison et al., 2005).

2.4. Statistical analyses

Results are presented as mean \pm S.E.M. Data were analyzed by Student's *t*-test. Statistical evaluation was performed with StatView 4.5 software (Abacus concepts, Inc). Mean differences with $P<0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

Naive Swiss albino male mice show a large heterogeneity in their anxiety levels as evaluated in the light/dark box test. There are also differences in the intracellular redox status in the blood lymphocytes, granulocytes and monocytes of the mice. The oxidative status of these leukocytic populations of each mouse was quantified by monitoring the emitted fluorescence intensity resulting from oxidation of intracellular dichlorofluorescein by reactive oxygen species. Results obtained using the Student's *t*-test revealed that high anxiety

Table 1

Effects of the high anxiety on the ROS level in the blood lymphocytes, granulocytes and monocytes oxidative status

Groups	Lymphocytes	Granulocytes	Monocytes
Low anxious	135 \pm 12	418 \pm 87	25 \pm 4
High anxious	215 \pm 31 ^a	1635 \pm 375 ^b	46 \pm 8 ^a

The results, mean fluorescent intensity (arbitrary units), are expressed as mean \pm S.E.M. ($n=10$). Fluorescence intensity emitted by immune cells is due to oxidation of intracellular DCFH by reactive oxygen species. ^aDenotes significant difference between low anxious and high anxious, $P<0.05$. ^bDenotes significant difference between low anxious and high anxious, $P<0.01$.

significantly increased the level of the reactive oxygen species in the peripheral blood lymphocytes ($P=0.026$), granulocytes ($P=0.0045$) and monocytes ($P=0.029$) (Table 1).

4. Discussion

The harmful physiological effects of anxiety include an increase in blood pressure, palpitations, nausea, dizziness, breathing difficulties, trembling, among others (Emilien et al., 2003). The present study in mice established that anxiety, which has been implicated in a number of psychiatric disorders such as generalized anxiety disorder, depression, panic attacks, phobias, obsessive–compulsive disorders, and posttraumatic stress disorders (Gross and Hen, 2004), induces peripheral oxidative stress highlighted by an increase in the generation of reactive oxygen species in the peripheral blood lymphocytes, granulocytes and monocytes. Oxidative stress can be defined as an imbalance between the formation of reactive oxygen species and the cellular antioxidant defence system in favour of the former (Halliwell and Gutteridge, 1999). *In vivo*, several pathways produce reactive oxygen intermediates, of which the mitochondrial respiratory chain is the main source (Delattre et al., 2005). When their production prevails over the cellular defence systems, however, damage to nucleic acids, proteins, lipids, and other cellular components can occur (Cadenas, 1989).

Fluorescent probes are excellent sensors of reactive oxygen species due to their high sensitivity and the simplicity of the data collection (Gomes et al., 2005). The short lifetime of reactive oxygen species and their numerous interactions with multiple antioxidants *in vivo* makes it difficult to measure these reactive intermediates (De Zwart et al., 1999). The DCFH-DA probe has been used to evaluate the intracellular redox status (Carini et al., 2000). Non-polar DCFH-DA crosses the cell membranes, and is hydrolysed by intracellular esterases to form polar, non-fluorescent dichlorofluorescein. This compound is then oxidized to a highly fluorescent substance, 2',7'-dichlorofluorescein, by intracellular reactive oxygen species (Rota et al., 1999; Carini et al., 2000; Bouayed et al., 2007a,b). The results obtained show that the high anxious mice have an elevated level of reactive oxygen species in their lymphocytes, granulocytes and monocytes as compared to the less anxious mice, suggesting the presence of oxidative stress in their peripheral leukocytes. The antioxidant/oxidant balance is an important determinant of immune cell function (Meydani et al., 1995). Decreased antioxidant status favours the accumulation of free radicals, which leads to oxidative stress and therefore significant damage to immune cells, leading to their dysfunction (Kraut and Sagone, 1981; Spletstoeser and Schuff-Werner, 2002; Halliwell et al., 1990; Halliwell, 2006). Excessive production of reactive oxygen species activates events that lead to death and survival in different types of cells (Simon et al., 2000). Taking into account the crucial role of these immune cells in the protection of organism and their role in the inflammatory process (Spletstoeser and Schuff-Werner, 2002; Kowalska et al., 2003; Halliwell, 2006; Hand et al., 2007), our results support that anxious mice are predisposed to recurrent infection, chronic inflammation, and to several pathologies such as cancer. Our

findings are in agreement with other reports showing that stressful situations were associated with excessive production of toxic oxygen metabolites. In this context, it has been demonstrated that chronic restraint stress, a physical stress that also has an anxiogenic character (Jones et al., 1988; Costall et al., 1989), induces oxidative stress (Sood et al., 2006; Madrigal et al., 2001). Additionally, it is well known that oxidative stress is linked to some behaviours, such as depression, pathological anxiety, and anxiety levels. Indeed, several authors have found that massive production of oxygen free radicals is associated with depression (Bilici et al., 2001; Szuster-Ciesilska et al., 2008; Michel et al., 2007). Moreover, it has been suggested that free radicals may play a role in the pathogenesis of anxiety disorders, since the erythrocytes of patients with obsessive-compulsive disorders and panic disorders may have higher levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutase (Kuloglu et al., 2002a,b). Recently, we have shown that the anxiety level in mice correlates with the oxidative status of peripheral granulocytes (Bouayed et al., 2007b). Using glyoxalase 1 as a marker, Krömer et al. (2005) and Ditzen et al. (2006) found a relationship between oxidative status and level of trait-anxiety. Hovatta et al. (2005) showed that anxiety and brain oxidative status are linked in six inbred mouse strains.

In conclusion, we have found significant differences in the level of reactive oxygen species in blood monocytes, granulocytes and lymphocytes of high anxious and less anxious mice of the same mouse strain. Naive mice are heterogeneous in regards to both their anxiety level and their peripheral oxidative status. Highly anxious mice might therefore be more predisposed to infections, chronic inflammation and cancer than low anxiety mice, as the oxidative stress is present in their peripheral defence cells. In a future study, the impact of high anxiety level on brain oxidative status of these mice will be evaluated.

Acknowledgements

The authors wish to thank Mr. F. Desor for his technical assistance.

References

- Belzung, C., Le Pape, G., 1994. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiol. Behav.* 56, 623–628.
- Bilici, M., Efe, H., Koroglu, M.A., Uydu, H.A., Bekaroglu, M., Dege, O., 2001. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. *J. Affect. Disord.* 64, 43–51.
- Bouayed, J., Rammal, H., Dicko, Amadou, Younos, C., Soulimani, R., 2007a. Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J. Neurol. Sci.* 262, 77–84.
- Bouayed, J., Rammal, H., Younos, C., Soulimani, R., 2007b. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 564, 146–149.
- Cadenas, E., 1989. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58, 79–110.
- Carini, M., Giancarlo, A., Piccone, M., Facino, R.M., 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *II Farmaco* 55, 526–534.
- Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Tomkins, D.M., 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32 (3), 777–785.
- Crawley, J.N., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 167–170.
- Delattre, J., Beaudeau, J.L., Bonnefont-Rousselot, D., 2005. Radicaux libres et stress oxydant. Aspects biologiques et pathologiques. Éditions Médicales internationales.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 202–226.
- Ditzen, C., Jastorff, A.M., Keßler, M.S., Bunck, M., Teplytska, L., Erhardt, A., Krömer, S.A., Varadarajulu, J., Targosz, B.S., Sayan-Ayata, E.F., Holsboer, F., Landgraf, R., Turck, C.W., 2006. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1914–1920.
- Emilien, G., Durlach, C., Fontaine-Delmotte, M., Fontaine, O., Boyer, P., 2003. L'anxiété sociale. Pierre Mardaga, pp. 3–25.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *J. Biochem. Biophys. Methods* 65, 45–80.
- Gross, C., Hen, R., 2004. The developmental origins of anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 545–552.
- Halliwell, B., 2006. Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31, 509–515.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford University Press, Oxford.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M., Hagen, T.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186, 1–85.
- Hand, W.L., Hand, D.L., Vasquez, Y., 2007. Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 76, 44–50.
- Harrison, J.F., Hollensworth, S.B., Spitz, D.R., Copeland, W.C., Wilson, G.L., LeDoux, S.P., 2005. Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance. *Nucleic Acids Res.* 33, 14.
- Hovatta, L., Tennant, R.S., Helton, R., Marr, R.A., Singer, O., Redwine, J.M., Ellison, J.A., Schadt, E.E., Verma, I.M., Lockhart, D.J., Barlow, C., 2005. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662–666.
- Jones, B.J., Costall, B., Domenech, A.M., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Oakley, N.R., Tyers, M.B., 1988. The potential anxiolytic activity of GR38032F, a 5-HT₃-receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol.* 93, 985–993.
- Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Hagen, T., Ieuewenburgh, C., 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac intermyofibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J.* 2622–2642.
- Kowalska, M.G., Kowalska, H., Zawadzka-Glos, L., Dębska, M., Szerszeń, E., Chmielik, M., Wąsik, M., 2003. Dysfunction of peripheral blood granulocyte oxidative metabolism in children with recurrent upper respiratory tract infections. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 67, 365–371.
- Kraut Jr., E.H., Sagone, A.L., 1981. The effect of oxidant injury on the lymphocyte membrane and functions. *J. Lab. Clin. Med.* 98, 697–703.
- Krömer, S.A., Keßler, M.S., Milfay, D., Birg, I.N., Bunck, M., Czibere, L., Panhuysen, M., Pütz, B., Deussing, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Turck, C.W., 2005. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J. Neurosci.* 25, 4375–4384.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Tuncok, H., Ustundag, B., 2002a. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 46, 27–32.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Ustundag, B., Bulut, S., 2002b. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 46, 186–189.
- Madrigal, J.L., Olivenza, R., Moro, M.A., Lizasoain, I., Lorenzo, P., Rodrigo, J., Leza, J.C., 2001. Glutathione depletion, lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction are induced by chronic stress in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24, 420–429.
- Meydani, S.N., Wu, D., Santos, M.S., Hayek, M., 1995. Antioxidants and immune response in aged persons: overview of present evidence. *Am. J. Clin. Nutr.* 62, 1462–1476.
- Michel, T.M., Frangou, S., Thiemeyer, D., Camara, S., Jecel, J., Nara, K., Brunklaus, A., Zoehling, R., Riederer, P., 2007. Evidence for oxidative stress in the frontal cortex in patients with recurrent depressive disorder—a postmortem study. *Psychiatry Res.* 151, 145–150.
- Misslin, R., Belzung, C., Vogel, E., 1989. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav. Processes* 18, 119–132.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J., 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* 18, 1791–1800.
- Rota, C., Chignell, C.F., Mason, R., 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 873–881.
- Simic, M.G., Bergtold, D.S., Karam, L.R., 1989. Generation of oxygen radicals in biosystems. *Mutat. Res.* 214, 3–12.
- Simon, H.U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5, 415–418.
- Sood, S., Narang, D., Thomas, M.K., Gupta, Y.K., Maulik, S.K., 2006. Effect of *Ocimum sanctum* Linn. on cardiac changes in rats subjected to chronic restraint stress. *J. Ethnopharmacol.* 108, 423–427.
- Spletstoeser, W.D., Schuff-Werner, P., 2002. Oxidative stress in phagocytes—the enemy within. *Microsc. Res. Tech.* 57, 441–445.
- Szuster-Ciesilska, A., Stotwińska, M., Stachura, A., Marmurowska-Michałowska, H., Dubas-Ślęmp, H., Bojarska-Junak, A., Kandefers-Szerszeń, M., 2008. Accelerated apoptosis of blood leukocytes and oxidative stress in blood of patients with major depression. *Prog. Neuro-psychopharmacol.* 32, 686–694.



Short communication

Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice

Jaouad Bouayed, Hassan Rammal, Chafique Younos, Rachid Soulimani*

LCA/Anxiété, Stress oxydant et bioactivité/ Ethnobotanique et Pharmacologie, Université P. Verlaine-Metz, Bricoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

Received 9 October 2006; received in revised form 21 February 2007; accepted 26 February 2007
Available online 7 March 2007

Abstract

Oxidative stress is involved in many acute and chronic diseases including cancer, cardiovascular disorders and neurodegenerative diseases. We studied the relationship between the level of intracellular reactive oxygen species in peripheral granulocytes and the estimated anxiety level of mice using the behavioral light/dark choice test. Our results indicate a linear and significant relationship between the intracellular redox status of peripheral blood granulocytes and different parameters of anxiety-related behavior including latency time ($R^2=0.737$, $P<0.001$), cumulative time spent in the lit box ($R^2=0.612$, $P<0.01$) and number of entries into the lit box ($R^2=0.661$, $P<0.01$). These results suggest a positive relationship between peripheral oxidative status and level of anxiety in mice.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Oxidative stress; Oxidative status; Light/dark choice test; Anxiety level

1. Introduction

Oxidative stress is mediated by reactive oxygen species generated during normal and aberrant cell metabolism using molecular oxygen. The imbalance that favors the production of reactive oxygen species such as O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , ROO^\cdot exceeding the capacity of the normal detoxification systems is a state termed oxidative stress, which leads to cellular damage caused by the interaction of reactive oxygen species with cellular constituents. The balance between antioxidation and oxidation is critical in maintaining a healthy biological system. Oxidative stress is involved in many acute and chronic diseases including cancer, cardiovascular disorders and neurodegenerative diseases (Montuschi et al., 2004; Hong and Liu, 2004; Judge et al., 2005; Pak et al., 2006; Katalinic et al., 2006). In 2005, Hovatta et al. first described a relationship between oxidative stress and the level of anxiety. They found a correlation between anxiety and the expression of two genes in the mouse brain (cingulate cortex): glyoxalase 1 and

glutathione reductase 1 which protect cells from oxidative damage. The aim of the present study is to establish a relationship between the intracellular redox status of the granulocytes and anxiety-related behaviors of mice at different anxiety levels. The light/dark box choice test was employed to estimate the level of anxiety in mice using the following behavioral parameters: (1) latency time, (2) cumulative time spent in the lit box and (3) number of entries into the lit box (Crawley and Goodwin, 1980; Crawley, 1981; Misslin et al., 1989; Belzung and Le Pape, 1994; Bourin and Hascoet, 2003). The flow cytometric analyses were carried out using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), a sensor of reactive oxygen species, to evaluate the peripheral blood granulocyte oxidative status of mice (Carini et al., 2000; Rota et al., 1999; Shen et al., 1996; Hong and Liu, 2004; Gomes et al., 2005).

2. Materials and methods

2.1. Animals

We used Swiss albino male mice (OF1), 9 weeks old at the time of reception from the breeder (Charles River, France)

* Corresponding author. Tel/fax: +33 0033387378504.
E-mail address: soulimani@univ-metz.fr (R. Soulimani).

ranging in weight from 40–45 g. The animals were housed with a 12-h light: 12-h dark schedule (lights on at 8:00 p.m.) with free access to water and food (SDS Dietex-France) and maintained at a constant temperature (21 ± 2 °C) and a relative humidity of $55 \pm 10\%$.

2.2. Behavioral test

2.2.1. Apparatus

The Light/Dark box apparatus consists of two compartments (light/dark, surface ratio 3:2), divided into 15 squares: 9×9 cm. The dark box (black PVC, $27 \times 18 \times 29$ cm) is illuminated by a dim red light (50 lx) and is divided into six squares. The lit box (white PVC, $27 \times 27 \times 29$ cm) is illuminated by a white light located 1.50 m above the device (150 lx at the level of the floor) and is divided into 9 squares. The two compartments communicate by means of a small door (7×7 cm). All animal procedures were carried out in accordance with the European Community Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.2.2. Procedure

All the experiments were carried out in a dark room and after each test the light/dark box was cleaned with a 10% ethanol solution. Each test took 180 s. At the beginning of the test, each animal was placed in the lit box; with its head facing the door of the dark box. The amount of time spent in the lit box, the number of entries into the lit box (all four feet), the latency time (latency of the first crossing from the dark to the lit box) were recorded after the first entry in the dark box.

2.3. Measurement of reactive oxygen species levels

2.3.1. Apparatus

Flow cytometry is used to separate the different immune cell populations according to size (forward light scatter, FSC) and relative granularity (side light scatter, SSC). FSC and SSC were used after excitation of the immune cells with a 488 nm argon laser beam. The level of intracellular reactive oxygen species was measured in the granulocytes by monitoring the emitted fluorescence of these cells (FACS-Scan, Becton-Dickinson, Immunofluorometry Systems, France).

2.3.2. Procedure

The mice were housed in groups (5 per cage). The level of anxiety in mice ($n=18$) was evaluated in the light/dark box choice test covered the full anxiety scale (anxious, intermediate and non-anxious). Animals were anaesthetized with halothane and then sacrificed. The collected blood was heparinized. Erythrolysis was carried out using 2 ml of lysing solution in 100 μ l of blood from each mouse. The samples were then placed in the dark for 10 min. After centrifugation at $447 \times g$ (5 min; 4 °C), the supernatant was eliminated. Then 2 ml of cellwash solution was added to the sediment containing the white cells and mixed. A second centrifugation was carried out in the same conditions. The supernatant was again eliminated. One ml of HBSS buffer and 5 μ l of DCFH-DA (50 μ M) were added to the

sediment (white cells) obtained by centrifugation, mixed and incubated in the dark for 15 min at 37 °C. As soon as the incubation was completed, the reactive oxygen species levels in the granulocytes of each mouse were measured using the flow cytometry technique.

3. Results

As shown in Fig. 1, naive Swiss albino male mice show a large heterogeneity in their anxiety levels as evaluated in the light/dark box test. There are also differences on the intracellular redox status of the mice blood granulocytes. The oxidative status of the granulocytes of each mouse was quantified by monitoring the emitted fluorescence intensity resulting from oxidation of intracellular dichlorofluorescein (DCFH) by reactive oxygen species. The scatter plots indicate a

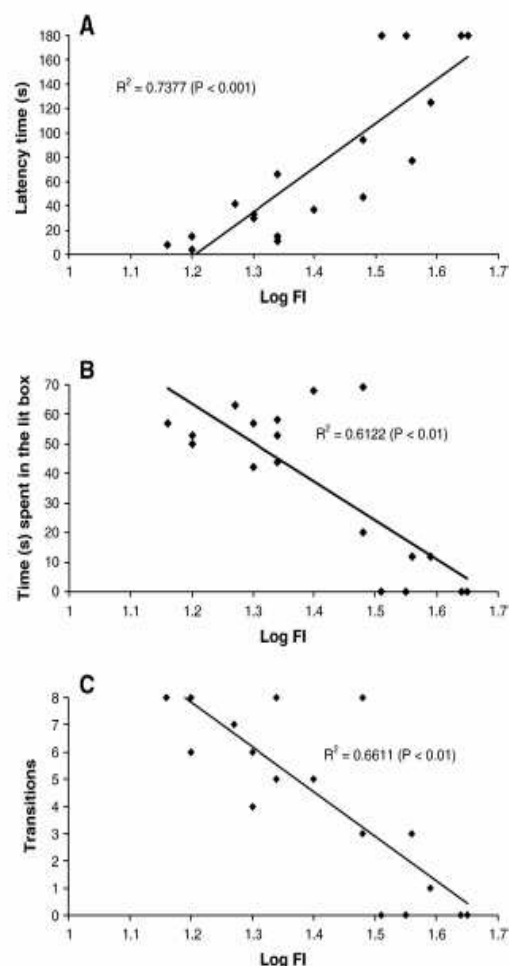


Fig. 1. Linear correlation between intracellular redox status and different parameters used for assessment of anxiety-related behavior in mice ($n=18$). Correlation of peripheral blood granulocyte oxidative status with latency of first crossing from dark to lit box (A), time spent in lit box (B) and number of transitions between two boxes (C), respectively. Fluorescence intensity (FI) expressed as a decimal logarithm. FI emitted by granulocytes is due to oxidation of intracellular DCFH by reactive oxygen species.

linear and significant relationship between the fluorescence intensity emitted by the granulocytes and the different measures used for the evaluation of anxiety: the latency time ($R^2=0.737$, $P<0.001$) (Fig. 1A), the cumulative time spent in the lit box ($R^2=0.612$, $P<0.01$) (Fig. 1B) and the number of entries into the lit box ($R^2=0.661$, $P<0.01$) (Fig. 1C), respectively.

4. Discussion

The short lifetime of reactive oxygen species and their numerous interactions with multiple antioxidants *in vivo* makes it difficult to measure these reactive intermediates (De Zwart et al., 1999; Gomes et al., 2005). Fluorescent probes are excellent sensors of reactive oxygen species due to their high sensitivity and the simplicity of the data collection (Gomes et al., 2005). The DCFH-DA probe has been used to evaluate the intracellular redox status (Carini et al., 2000). Non-polar DCFH-DA crosses the cell membranes, and is hydrolysed by intracellular esterases to form polar, non-fluorescent dichlorofluorescein (DCFH). This compound is then oxidized to a highly fluorescent substance, 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by intracellular reactive oxygen species (Carini et al., 2000; Rota et al., 1999; Shen et al., 1996). The results obtained suggest that the intracellular redox status of the granulocytes is statistically and significantly correlated with the level of anxiety in mice (Fig. 1). Our results highlight the existence of a positive correlation between peripheral oxidative status and the level of anxiety in mice. The reactive oxygen species level increases in the granulocytes of mice with higher anxiety, so blood granulocytes of anxious mice present a high oxidative status compared with mice with intermediate anxiety (moderately-anxious) and non-anxious mice (Fig. 1). These results suggest that peripheral blood granulocytes of anxious mice may be more prone to oxidative damage because their intracellular reactive oxygen species level is high. Oxidative damage due to oxidative stress may lead to blood granulocytes dysfunction. The granulocytes play a key role in the defence against bacterial infections and their dysfunction may predispose to infections (Kowalska et al., 2003). Oxidative stress of blood granulocytes has been observed in several diseases. Peripheral blood granulocytes of type 2 diabetes patients present a higher vulnerability to oxidative damage and significant increase in oxidative DNA damage was observed in the granulocytes of diabetic patients (Pitozzi et al., 2003). Increase in oxidative stress of granulocytes was observed in hypertensive patients (Yasunari et al., 2002).

Extreme and persistent anxiety is probably pathological. Beyond a certain level it becomes an unpleasant emotional state leading to abnormal behavior. Pathological anxiety invokes feelings of stress, fear, nervousness and anguish. The physiological effects of anxiety include an increase in blood pressure, palpitations, nausea, dizziness, breathing difficulties, trembling, etc (Emilien et al., 2003). It has been suggested that free radicals may play a role in the pathogenesis of anxiety disorders (obsessive-compulsive disorder and panic disorder) since the erythrocytes of these patients may have higher levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and

superoxide dismutases (Kuloglu et al., 2002a, 2002b). The relationship between the cerebral oxidative status and the level of anxiety was first described by Hovatta et al. (2005) who found in mice overexpression *in vivo* of glyoxalase 1 or glutathione reductase 1 in the cingulate cortex with increase in anxiety-like behavior while inhibition of glyoxalase 1 expression occurred with decreased levels of anxiety-like behavior of mice. Our results showed that anxiety and peripheral oxidative status are statistically and significantly correlated (Fig. 1) in agreement with results on brain oxidative status and anxiety (Hovatta et al., 2005). However, the relation between trait anxiety and central oxidative status is more complex given that glyoxalase 1 is expressed at higher levels in low anxiety mice compared with anxious mice. The same phenotype-dependent difference was found in red blood cells (Krömer et al., 2005; Ditzen et al., 2006). Our results indicate a positive and significant correlation between level of anxiety and reactive oxygen species in blood granulocytes, with linear increase in granulocyte reactive oxygen species at higher levels of anxiety in mice. Naive mice are heterogeneous as regards both their anxiety level and their peripheral oxidative status.

Acknowledgements

We are grateful to Pr. Didier Desor (Neurosciences, URAFFA, Université Henri Poincaré, Nancy) for helpful discussions and to Frédéric Desor for his technical assistance. We thank Research Department of BOIRON Laboratory for financial support.

References

- Belzung, C., Le Pape, G., 1994. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiology & Behavior* 56, 623–628.
- Bourin, M., Hascoet, M., 2003. The mouse light/dark box test. *European Journal of Pharmacology* 463, 55–65.
- Carini, M., Giancarlo, A., Piccone, M., Facino, R.M., 2000. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. *Il Farmaco* 55, 526–534.
- Crawley, J.N., 1981. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 15, 695–699.
- Crawley, J.N., Goodwin, F.K., 1980. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 13, 167–170.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H., Commandeur, J.N., Vermeulen, N.P., 1999. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 202–226.
- Ditzen, C., Jastorff, A.M., Keßler, M.S., Bunck, M., Teplytska, L., Erhardt, A., Krömer, S.A., Varadarajulu, J., Targosz, B.S., Sayan-Ayata, E.F., Holsboer, F., Landgraf, Rainer, Turck, C.W., 2006. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Molecular & Cellular Proteomics* 5, 1914–1920.
- Emilien, G., Durlach, C., Fontaine-Delmotte, M., Fontaine, O., Boyer, P., 2003. L'anxiété sociale. *Pierre Mardaga*, pp. 3–25.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J.L., 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 65, 45–80.
- Hong, H., Liu, G., 2004. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sciences* 74, 2959–2973.
- Hovatta, L., Tennant, R.S., Helton, R., Marr, R.A., Singer, O., Redwine, J.M., Ellison, J.A., Schadt, E.E., Verma, I.M., Lockhart, D.J., Barlow, C., 2005.

- Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 438, 662–666.
- Judge, S., Jang, Y.M., Smith, A., Hagen, T., leeuwenburgh, C., 2005. Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB Journal* 2622–2642.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jukic, M., 2006. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry* 94, 550–557.
- Kowalska, M., Kowalska, H., Zawadzka-Glos, L., Debska, M., Szerszen, E., Chmielik, M., Wasik, M., 2003. Dysfunction of peripheral blood granulocyte oxidative metabolism in children with recurrent upper respiratory tract infections. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 67, 365–371.
- Krömer, S.A., Kößler, M.S., Milfay, D., Birg, I.N., Bunck, M., Czibere, L., Panhuysen, M., Pütz, B., Deussing, J.M., Holsboer, F., Landgraf, R., Turck, C.W., 2005. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Journal of Neuroscience* 25 (17), 4375–4384.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Tunckol, H., Ustundag, B., 2002a. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 46, 27–32.
- Kuloglu, M., Atmaca, M., Tezcan, E., Gecici, O., Ustundag, B., Bulut, S., 2002b. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 46, 186–189.
- Misslin, R., Belzung, C., Vogel, E., 1989. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behavioural Processes* 18, 119–132.
- Montuschi, P., Barnes, P.J., Roberts, L.J., 2004. Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB Journal* 18, 1791–1800.
- Pak, J.H., Kim, T., Kim, M.J., Kim, J.Y., Choi, H., Kim, S.A., Tchah, H., 2006. Reduced expression of l-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. *Experimental Eye Research* 82, 899–906.
- Pitozzi, V., Giovannelli, L., Bardini, G., Rotella, C.M., Dolaro, P., 2003. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutation Research* 529, 129–133.
- Rota, C., Chignell, C.F., Mason, R., 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implication for oxidative stress measurements. *Free Radical Biology & Medicine* 27, 873–881.
- Shen, H.M., Shi, C.Y., Shen, Y.L., Ong, C.N., 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. *Free Radical Biology & Medicine* 21, 139–146.
- Yasunari, K., Maeda, K., Nakamura, M., Yoshikawa, J., 2002. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* 39, 777–780.



Comparative evaluation of the antioxidant potential of some Iranian medicinal plants

Jaouad Bouayed^a, Khosro Piri^b, Hassan Rammal^a, Amadou Dicko^a, Frédéric Desor^a,
Chafique Younos^a, Rachid Soulimani^{a,*}

^a *Ethnobotanique et Pharmacologie (LCA)/Anxiété, Stress oxydant et Bioactivité, Université P. Verlaine - Metz, BP 4102, 57040 Metz Cedex 01, France*

^b *Département de biotechnologie, Université Bu-Ali Sina, Bd Manochehri Hamadan, Iran*

Received 11 May 2006; received in revised form 27 September 2006; accepted 22 November 2006

Abstract

Medicinal plants are a source for a wide variety of natural antioxidants. In the study reported here, we have conducted a comparative study between five medicinal plants having the same geographic origin: the Hamadan region in the west of Iran and growing in the same natural conditions. The amount of total phenolics and total flavonoids for parts of these plants used in Iranian popular medicine were evaluated. Furthermore, antioxidant activities for these parts using vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) test were also evaluated. The results show that the antioxidant activities varied greatly among the different plant parts used in this study and some plants are rich in natural antioxidants especially leaves of *Lavandula officinalis* and of *Melissa officinalis*. A positive correlation between total phenolic or flavonoid contents and VCEAC was found with a correlation coefficient of $R^2 = 0.961$ and $R^2 = 0.817$, respectively. These findings show that phenolics in these plants provide substantial antioxidant activity.
© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Medicinal plants; Phenolics; Flavonoids; Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC)

1. Introduction

Oxidative stress is mediated by reactive oxygen species (ROS) which are generated during the normal and aberrant cellular metabolism that utilizes molecular oxygen. The imbalance between production of ROS like O_2^- , H_2O_2 , OH^\cdot , ROO^\cdot and the capacity of the normal detoxification systems in favour of the oxidants leads to oxidative stress, which itself leads to cellular damage caused by the interaction of ROS with cellular constituents. Oxidative stress is involved in many acute and chronic diseases including cancer, cardiovascular troubles and neurodegenerative diseases. The balance between antioxidation and oxidation is believed to be critical in maintaining a healthy biological system (Hong & Liu, 2004; Judge, Jang, Smith, Hagen, &

Leeuwenburgh, 2005; Katalinic, Milos, Kulisic, & Jukic, 2006; Montuschi, Barnes, & Roberts, 2004; Pak et al., 2006).

Recently, many researchers have taken a great interest in medicinal plants for their phenolic concentrations and related total antioxidant potential (Djeridane et al., 2006; Katalinic et al., 2006; Wong, Li, Cheng, & Chen, 2006). It is reported that some medicinal plants contain a wide variety of natural antioxidants, such as phenolic acids, flavonoids and tannins, which possess more potent antioxidant activity than dietary plants (Wong et al., 2006). Many investigations indicate that these compounds are of great value in preventing the onset and/or progression of many human diseases (Halliwell & Gutteridge, 1989; Halliwell, Gutteridge, & Cross, 1992). The health-promoting effect of antioxidants from plants is thought to arise from their protective effects by counteracting reactive oxygen species (ROS) (Wong et al., 2006).

* Corresponding author. Tel./fax: +33 387378504.

E-mail address: soulimani@sciences.univ-metz.fr (R. Soulimani).

The purposes of this study were to determine the content of total phenolics and total flavonoids and to evaluate total antioxidant activity of five Iranian medicinal plants using the vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) test.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Aluminium chloride (AlCl_3), Catechin and Gallic acid were purchased from Acros Organics. Ascorbic acid, 2,2'-azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)diammonium salt (ABTS), PBS buffer, 2,2'-azobis(2methylpropionamide)dichloride (AAPH), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, Sodium carbonate (Na_2CO_3) and Sodium nitrite (NaNO_2) were purchased from Sigma Chemical Company.

2.2. Plant material and protocol

Five medicinal plants were collected from the Hamadan region in the west of Iran. Plant parts have been chosen in relation to Iranian popular medicine use: flowers of *Alcea kurdica* (Malvaceae), flowers of *Stachys lavandulifolium* (Lamiaceae), root of *Valeriana officinalis* (Valerianaceae), leaves of *Lavandula officinalis* (Lamiaceae) and leaves of *Melissa officinalis* (Lamiaceae).

Contrary to the other plants, *A. kurdica* and *S. lavandulifolium* are endemic flora of the Hamadan region.

The extractions were carried out using the same protocol. Grinded plant parts macerated in pure water for 12 h at room temperature, and then for 12 h at 37 °C temperature. Afterwards the filtrate was lyophilised.

2.3. Determination of total phenolics

Total phenolic contents were evaluated with Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Kim, Chun, Kim, Moon, & Lee, 2003) using spectrophotometric analysis (Cary 50 Scan UV-Visible apparatus). Briefly, an aliquot (1 ml) of standard solutions of gallic acid at different concentrations or appropriately diluted extracts was added to a 25 ml volumetric flask containing 9 ml of ddH_2O . A reagent blank using ddH_2O was prepared. One milliliter of Folin and Ciocalteu's phenol reagent was added to the mixture and shaken. After 5 min, 10 ml of 7% Na_2CO_3 solution was added with mixing. The solution was then immediately diluted to volume (25 ml) with ddH_2O and mixed thoroughly. After incubation for 90 min at 23 °C, the absorbance versus prepared blank was read at 750 nm. Total phenolic contents in medicinal plants were expressed as mg gallic acid equivalents (GAE)/g dry weight. Samples were analyzed in three replications.

2.4. Determination of total flavonoids

Total flavonoid contents were measured according to a colorimetric assay (Zhishen, Mengcheng, & Jianming,

1999). A 1 ml aliquot of standard solutions of catechin at different concentrations or appropriately diluted samples was added to a 10 ml volumetric flask containing 4 ml ddH_2O . At zero time, 0.3 ml 5% NaNO_2 was added to the flask. After 5 min, 0.3 ml 10% AlCl_3 was added. At 6 min, 2 ml of 1 M NaOH was added to the mixture. Immediately, the solution was diluted to volume (10 ml) with ddH_2O and mixed thoroughly. Absorbance of the mixture, pink in colour, was determined at 510 nm versus the prepared blank. Total flavonoid contents in medicinal plants were expressed as mg catechin equivalents (CE)/g dry weight (dw). Samples were analyzed in three replications.

2.5. Determination of total antioxidant activity using ABTS radical scavenging capacity assay

VCEAC test developed by Kim, Chun, et al. (2003) was used in this study. Total antioxidant activities of medicinal plants were determined by scavenging blue-green ABTS radicals and were expressed as mg vitamin C equivalent (VCE) per g dry weight.

Briefly, 1 mM AAPH, a radical initiator, was mixed with 2.5 mM ABTS in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The mixed solution was heated in a water bath at 68 °C for 13 min. The resulting blue-green ABTS radical solution was adjusted to the absorbance of 0.650 ± 0.020 at 734 nm with additional PBS. Twenty microliters of sample was added to 980 μl of the ABTS radical solution. The mixture was incubated in a 37 °C water bath under restricted light for 10 min. The control consisted of 20 μl 50% methanol and 980 μl of ABTS radical solution. The decrease of absorbance at 734 nm was measured 10 min later. Samples were analyzed in three replications.

2.6. Statistical analysis

Data were reported as mean \pm standard deviation. To examine antioxidant activity differences between extracts, we have used ANOVA followed by PLSD of Fisher test. For all statistical comparisons, the level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using the Statview[®] 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc.).

3. Results

3.1. Determination of total phenolics

Table 1 shows the traditional uses of some plants in Iranian society and their total phenolic contents, which varied between 2.15 and 20.3 mg of GAE/g dw. The highest concentration of total phenolics was observed in leaves of *M. officinalis*, followed by leaves of *L. officinalis*, flowers of *S. lavandulifolium* and root of *V. officinalis*. The flowers of *A. kurdica* had the lowest phenolics concentration.

Table 1
Medicinal uses of some Iranian plant parts and their amounts of total phenolics

Scientific name	Plant parts used in Iranian popular medicine and their effects and/or uses	Total phenolics (mg GAE/g dw)
<i>A. kurdica</i>	Flowers: inflammation and cough (Piri et al., 2006)	2.15 ± 0.1
<i>V. officinalis</i>	Root: depression (Fintelmann & Weiss, 2004)	6.31 ± 0.14
<i>S. lavandulifolium</i>	Flowers: depression (Rabbani et al., 2003; Rabbani et al., 2005)	14.1 ± 0.21
<i>L. officinalis</i>	Leaves: sedative (Piri, Personal information)	16.2 ± 0.59
<i>M. officinalis</i>	Leaves: anti-viral (Fintelmann & Weiss, 2004)	20.3 ± 0.19

The data are displayed with mean ± standard deviation of three replications. The contents of total phenolics in plants were expressed as gallic acid equivalent (GAE) per 1 g dry weight.

3.2. Determination of total flavonoids

The concentrations of total flavonoids of five Iranian medicinal plants varied between 0.22 and 10.0 mg of CE/g dw (Table 2). Leaves of *M. officinalis* exhibited the highest flavonoids concentration followed by leaves of *L. officinalis*, flowers of *S. lavandulifolium* and root of *V. officinalis*. The flowers of *A. kurdica* had the lowest flavonoids concentration.

3.3. Antioxidant activities

The total antioxidant activities quantified by VCEAC assay are presented in Table 2. ANOVA revealed significant differences between extracts (Fig. 1) with respect to total antioxidant activity ($F(4,10) = 113.15$; $p < 0.0001$). Fisher test did not reveal any significant difference between leaves of *M. officinalis* and of *L. officinalis* with respect to total antioxidant activity ($p > 0.05$).

Flowers of *S. lavandulifolium*, root of *V. officinalis* and flowers of *A. kurdica* exhibited significantly less antioxidant activity than Leaves of *M. officinalis* and leaves of *L. officinalis* ($p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.001$, respectively).

4. Discussion

The total phenolic and the total flavonoid contents of 1 g dry weight of plant parts traditionally used ranged from 2.15 to 20.3 mg of GAE and from 0.22 to 10.0 mg of CE, respectively (Tables 1 and 2). The total phenolics and the total flavonoids showed the similar tendency in ranking:

Table 2
Total flavonoid contents in parts of some Iranian medicinal plants and their total antioxidant activities quantified by VCEAC assay

Scientific name	Total flavonoids (mg CE/g dw)	VCEAC (mg VCE/g dw)
<i>A. kurdica</i>	0.22 ± 0.004	2.8 ± 0.05
<i>V. officinalis</i>	1.1 ± 0.04	7.36 ± 0.09
<i>S. lavandulifolium</i>	4.02 ± 0.02	15.4 ± 0.47
<i>L. officinalis</i>	6.18 ± 0.18	19.2 ± 0.42
<i>M. officinalis</i>	10.0 ± 0.32	19.3 ± 1.35

The data are displayed with mean ± standard deviation of three replications. The contents of total flavonoids in plant parts and their total antioxidant activities estimated by VCEAC assay were expressed as catechin equivalent (CE) and vitamin C equivalent (VCE) per 1 g dry weight, respectively.

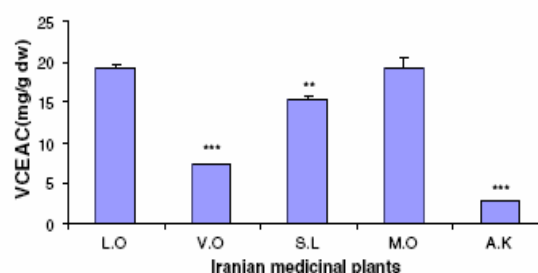


Fig. 1. Comparison of total antioxidant activities for parts of some Iranian medicinal plants estimated by VCEAC assay and expressed as vitamin C equivalent (VCE) per g dry weight. L.O, V.O, S.L, M.O, A.K stand for leaves of *L. officinalis*, root of *V. officinalis*, flowers of *S. lavandulifolium*, leaves of *M. officinalis* and flowers of *A. kurdica*, respectively. Data represent mean ± standard deviation of three replications. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

leaves of *M. officinalis* followed by leaves of *L. officinalis*, root of *V. officinalis*, flowers of *S. lavandulifolium* and flowers of *A. kurdica*. The three first medicinal plant parts are potentially rich sources of natural antioxidants. However, flowers of *A. kurdica* are poor in polyphenols, their total phenolic and flavonoid amounts were approximately nine-fold and 45-fold lower than leaves of *M. officinalis*, respectively. The medicinal plants have the same geographic origin and grow in the same natural conditions; nevertheless the plants belong to different families and the parts used in this study are not the same. It is well known that the amount of total phenolics vary in different parts of the same plant, moreover it has been reported that the amount of total phenolics vary with respect to families and varieties (Djeridane et al., 2006; Kahkonen et al., 1999; Kaur & Kapoor, 2002; Romani et al., 2003; Sellappan & Akoh, 2002). To evaluate antioxidant activities VCEAC test developed by Kim, Chun, et al. (2003) was employed. This test is a good method for measuring the antioxidant activity of extracts or individual chemical compounds (Chun, Kim, Moon, Kang, & Lee, 2003; Kim, Chun, et al., 2003; Kim, Jeong, & Lee, 2003). The different plant parts used display scavenging activities for ABTS radical. We found that the total antioxidant activities varied greatly among the different parts, since they ranged from 2.8 to 19.3 mg of VCE/g dw (Table 2). Based on this data, we can classify medicinal plants into two groups. The first one showing an identical and high antioxidant activity

profile constituted by leaves of *L. officinalis* and of *M. officinalis*. The second one exhibiting low antioxidant activity constituted by root of *V. officinalis*, flowers of *S. lavandulifolium* and flowers of *A. kurdica*. The difference between these two groups was significant with respect to antioxidant activity (Fig. 1). Antioxidants are substances that delay the oxidation process, inhibiting the polymerization chain initiated by free radicals and other subsequent oxidizing reactions (Halliwell & Aruoma, 1991). Phenolic constituents, such as flavonoids, phenolic acids and tannins are well known for their high antioxidant activity (Rice-Evans, Miller, & Paganda, 1996; Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992). Epidemiological studies suggest that the consumption of flavonoid-rich foods protects against human diseases associated with oxidative stress, like coronary heart disease and cancer (Duthie, Duthie, & Kyle, 2000; Lambert & Yang, 2003; Renaud & de Lorgeril, 1992). The protective effect provided by fruits and vegetables against cancer, cardio and cerebrovascular diseases, has been attributed to their antioxidant compounds (Ames, 1983; Gey, 1990). The majority antioxidant capacity of plants is not only represented by vitamin C, vitamin E or β -carotene, but is also due to other compounds such as polyphenols which have a strong antioxidant potential (Bors & Saran, 1987). Many studies indicate a linear relationship between total phenolics and antioxidant activity (Djeridane et al., 2006; Kim, Chun, et al., 2003; Kim, Jeong, et al., 2003). In this study, we found that phenolic compounds are major contributors to antioxidant activity, since total phenolics and antioxidant activity showed a good correlation with a correlation coefficient of $R^2 = 0.961$ (Fig. 2). However, antioxidant capacity and total flavonoids showed a relatively weak relationship with a correlation coefficient of $R^2 = 0.817$ (Fig. 3). A similar result was previously observed by Kim, Chun, et al. (2003). Our results are in agreement with previous reports that the phenolic compounds contribute significantly to the antioxidant activity in medicinal plants (Cai, Luo, Sun, & Corke, 2004; Djeridane et al., 2006; Tang et al., 2004; Wong et al., 2006).

In conclusion, the amount of phenolics, flavonoids and related total antioxidant activity of some Iranian medicinal plant parts were evaluated. Antioxidant activity varied

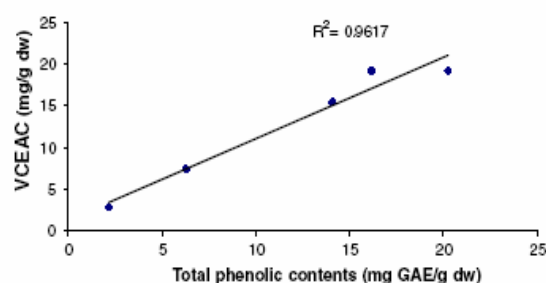


Fig. 2. Positive correlation between total phenolics and VCEAC for some Iranian medicinal plants.

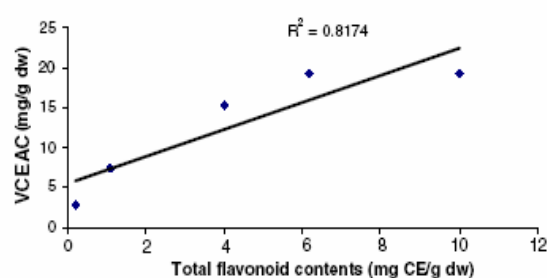


Fig. 3. Positive correlation between total flavonoids and VCEAC for some Iranian medicinal plants.

greatly among the different plant parts used in this study, but it was highly correlated with the content of polyphenolics. Therefore, we take an interest in leaves of *M. officinalis* and of *L. officinalis*, since they exhibited important antioxidant activities and present a good source of natural antioxidants. After this comparative study, our objective will be identification and determination of the amount of individual polyphenolics responsible for the majority of antioxidant activity in leaves of these two plants.

References

- Ames, B. M. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, *221*, 1256–1263.
- Bors, W., & Saran, M. (1987). Radical scavenging by flavonoid antioxidants. *Free Radical Research Communications*, *2*, 289–294.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., & Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, *74*, 2157–2184.
- Chun, O. K., Kim, D. O., Moon, H. Y., Kang, H. G., & Lee, C. Y. (2003). Contribution of individual polyphenolics to total antioxidant capacity of plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 7240–7245.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., & Vidal, N. (2006). Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, *97*, 654–660.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J., & Kyle, J. A. M. (2000). Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutrition Research Reviews*, *13*, 79–106.
- Fintelmann, V., & Weiss, R. F. (2004). *Manuel pratique de Phytothérapie*. Edition VIGOT, pp. 48–270.
- Gey, K. F. (1990). The antioxidant hypothesis of cardiovascular disease: epidemiology and mechanisms. *Biochemical Society Transactions*, *18*, 1041–1045.
- Halliwell, B., & Aruoma, O. I. (1991). DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, *281*, 9–19.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (1989). *Free radicals in biology and medicine*. Oxford: Clarendon Press.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *119*, 598–619.
- Hong, H., & Liu, G. (2004). Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sciences*, *74*, 2959–2973.
- Judge, S., Jang, Y. M., Smith, A., Hagen, T., & Leeuwenburgh, C. (2005). Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac inter-fibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *The FASEB Journal*, *26*, 22–2642.

- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.-P., Pihlaja, K., & Kujala, T. S. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 3954–3962.
- Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., & Jukic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, *94*, 550–557.
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, *37*, 153–161.
- Kim, D. O., Chun, O. K., Kim, Y. J., Moon, H. Y., & Lee, C. Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 6509–6515.
- Kim, D. O., Jeong, S. W., & Lee, C. Y. (2003). Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chemistry*, *81*, 321–326.
- Lambert, J. D., & Yang, C. S. (2003). Mechanisms of cancer prevention by tea constituents. *Journal of Nutrition*, *133*, 3262S–3267S.
- Montuschi, P., Barnes, P. J., & Roberts, L. J. (2004). Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *The FASEB Journal, Review*, *18*, 1791–1800.
- Pak, J. H., Kim, T., Kim, M. J., Kim, J. Y., Choi, H., Kim, S. A., et al. (2006). Reduced expression of 1-cys peroxiredoxin in oxidative stress-induced cataracts. *Experimental Eye Research*, *82*, 899–906.
- Piri, K., Calvandi, R., Younos, C., & Soulimani, R. (2006). *Une expérience pilote au niveau de la région Hamadan pour l'élaboration d'une pharmacopée Iranienne*. Le 2ème colloque Scientifique international de Substances Naturelles: Bioplanta, Tunisie.
- Rabbani, M., Sajjadi, S. E., & Jalali, A. (2005). Hydroalcohol extract and Fractions of *Stachys lavandulifolia* Vahl: effects on spontaneous motor activity and elevated plus-maze behaviour. *Phytotherapy Research*, *19*, 854–858.
- Rabbani, M., Sajjadi, S. E., & Zarei, H. R. (2003). Anxiolytic effects of *Stachys lavandulifolia* Vahl on the elevated plus-maze model of anxiety in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, *89*, 271–276.
- Renaud, S., & de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets and French paradox of coronary heart disease. *Lancet*, *339*, 1523–1526.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. M., & Paganda, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, *20*, 933–956.
- Romani, A., Vignolini, P., Galardi, C., Aroldi, C., Vazzana, C., & Heimler, D. (2003). Polyphenolic content in different plant parts of soy cultivars grown under natural conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 5301–5306.
- Sellappan, S., & Akoh, C. C. (2002). Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown vidalia onions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 5338–5342.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical Review in Food Sciences and Nutrition*, *32*, 67–103.
- Tang, S. Y., Whiteman, M., Peng, Z. F., Jenner, A., Yong, E. L., & Halliwell, B. (2004). Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional Chinese medicine. *Free Radical Biology and Medicine*, *36*, 1575–1587.
- Wong, C., Li, H., Cheng, K., & Chen, F. (2006). A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay. *Food Chemistry*, *97*, 705–711.
- Zhishen, J., Mengcheng, T., & Jianming, W. (1999). The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, *64*, 555–559.

Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects

Jaouad Bouayed^a, Hassan Rammal^a, Amadou Dicko^b,
Chafique Younos^a, Rachid Soulimani^{a,*}

^a *Ethnobotanique et Pharmacologie/ Anxiété, Stress Oxydant et Bioactivité, Université P. Verlaine Metz, BP 4102, 57040, Metz Cedex 01, France*

^b *LCME, Université P. Verlaine Metz, Technopôle, France*

Available online 14 August 2007

Abstract

Background: Oxidative stress is linked to neurodegenerative diseases, cancer, cardiovascular diseases and to some behaviors, such as anxiety and depression. In particular, recent research observed a close relationship between oxidative stress and anxiety.

Methods: We investigated the anxiolytic effect of chlorogenic acid, a dietary antioxidant present in fruits, in mouse models of anxiety including the light/dark test, the elevated plus maze and the free exploratory test. Moreover, the antioxidative effect of chlorogenic acid on peripheral blood granulocytes was investigated.

Results: Chlorogenic acid (20 mg/kg) induced a decrease in anxiety-related behaviors suggesting an anxiolytic-like effect of this polyphenol. The anti-anxiety effect was blocked by flumazenil suggesting that anxiety is reduced by activation of the benzodiazepine receptor. *In vitro*, chlorogenic acid protected granulocytes from oxidative stress.

Conclusions: Chlorogenic acid is one of the most abundant polyphenols in fruits. We demonstrated *in vivo* and *in vitro* for the first time, that chlorogenic acid has anxiolytic effects coupled with antioxidant activity. Thus, fruits such as plums (Mirabelle), apples and cherries may provide health-promoting advantages to consumers.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chlorogenic acid; Anxiety; Anxiolytic effect; Granulocytes; Oxidative stress; Antioxidant activity; Anxi-oxydatif stress

1. Introduction

A link between oxidative stress and levels of anxiety has been recently postulated. Hovatta et al. [1] reported the close relationship existing between the expression of two cerebral genes which protect the cells against oxidative damage and anxiety-related behavioral phenotypes in six inbred mouse strains. These authors [1] hypothesized that glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. Local overexpression in the murine brain of these two genes resulted in increase of anxiety-like behavior anxiety, while inhibition of glutathione reductase 1 expression produced

low-anxiety mice. However, the relation between trait anxiety and central oxidative status is more complex given that glyoxalase 1 is expressed at higher levels in low anxiety mice compared with anxious mice. The same phenotype-dependent difference was found in red blood cells [2,3]. The implication of oxidative stress in the pathogenesis of anxiety disorders (obsessive–compulsive disorder and panic disorder) was also suggested by Kuloglu et al. [4,5] who observed that erythrocytes of patients with anxiety disorders may have higher levels of the antioxidant enzymes glutathione peroxidase and superoxide dismutases. We have reported statistically significant linear relationships between oxidative status of blood granulocytes and level of anxiety in mice [6]. In the present study, we investigated the effect of a polyphenol called chlorogenic acid (Fig. 1) naturally presents in fruits (plums, apples, cherries, etc) and reputed

* Corresponding author. Tel./fax: +33 387378504.

E-mail address: soulimani@univ-metz.fr (R. Soulimani).

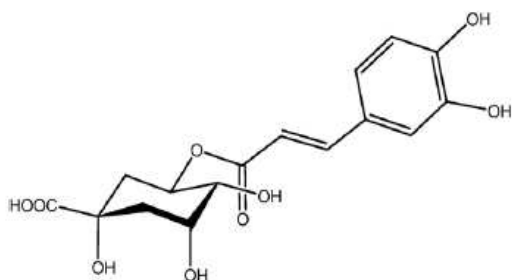


Fig. 1. Chemical structure of chlorogenic acid (5-O-caffeoylquinic acid).

by its antioxidant activity [7,8] on two types of anxieties in mice (state anxiety and trait anxiety). In our laboratory, chlorogenic acid was initially identified and quantified in Mirabelle (*Prunus x domestica* L) using reversed-phase high-performance liquid chromatography. To estimate state anxiety, the light/dark test and elevated plus maze were used. To evaluate trait anxiety, the free exploratory test was employed. Moreover, we studied *in vitro* the antioxidative effect of chlorogenic acid on peripheral blood granulocytes.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Swiss albino male mice (OF1) aged 9 weeks at the receipt from the breeder company (Charles River, France) and weighing 40–45 g were used. The animals were housed under a 12-h light:12-h dark schedule (lights on starting at 8:00 p.m.) with water and food *ad libitum* (SD Dietex-France). Animal rooms were at a constant temperature of 21 ± 2 °C and relative humidity of $55 \pm 10\%$. All animal procedures were carried out in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC).

2.2. Behavioral studies

The light/dark choice procedure is a typical conditioned conflict situation based on the natural tendencies of mice to avoid a bright-lit enclosure and to escape from a novel environment when forced into it [9,10]. The elevated plus maze represents a forced exploration, *i.e.*, no non-stressed situation, since all parts of the situation are novel [11,12]. This is a frequently used animal model of anxiety due to the use of unconditioned spontaneous behavior [13]. The free exploratory test assesses responses toward novel places [14,15]. This model appears to have no stressful components. The free exploratory test reveals trait anxiety and is more specific for the assessment of neophobia or aversion to an unfamiliar environment [12,15].

2.2.1. Light/dark choice test

The Light/Dark box apparatus consists of two compartments (light/dark, surface ratio 3:2), divided into 15 squares:

9×9 cm. The dark box (black PVC, 27×18×29 cm) is illuminated by a dim red light and is divided into six squares. The lit box (white PVC, 27×27×29 cm) is illuminated by a white light located 1.50 m above the device and is divided into 9 squares. The two compartments communicate by means of a small door (7×7 cm). All the experiments were carried out in a dark room and after each test the light/dark box was cleaned with a 10% ethanol solution. Each test took 5 min. At the beginning of the test, each animal was placed in the lit box with its head facing the door of the dark box. The amount of time spent in the lit box, the number of entries into the lit box (all four feet), the latency time and locomotion in both lit and dark box were recorded after the first entry in the dark box. Drugs were administered intraperitoneally 30 min before testing. Ten animals per group were used for each drug. All doses were administered in a volume of 10 ml/kg. Mice were randomly allocated to the following groups: vehicle control (physiological saline, 0.9% NaCl), chlorogenic acid (Across Organics) (2 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg in saline), diazepam (1 mg/kg in saline).

2.2.2. Elevated plus maze

All parts of the apparatus were made of dark polyvinyl plastic. The maze was elevated to a height of 50 cm and had two open (30×5 cm) and two closed arms (30×5×15 cm), arranged in a manner that the arms of the same type were opposite to each other and connected by an open central square (5×5 cm). To prevent mice from falling of the open arms, a rim (2.5 mm high and 8 mm deep) surrounded the perimeter of the open arms. At the beginning of the 5-min test session, mice naive to the apparatus and with no previous drug treatment were placed individually in the central square of the maze, facing one of the closed arms. An entry in the arm was counted when the animal placed all four paws into the arm. The total number of visits to the open arms, the total number of visits to the closed arms and the cumulative time spent in the open arms were recorded. The results were expressed in number of entries into closed arms, percentage of time spent in the open arms and percentage of entries into open arms. After each test, the apparatus was cleaned with a 10% ethanol solution. Drugs were administered intraperitoneally 30 min before testing. Ten animals per group were used for each drug. All doses were administered in a volume of 10 ml/kg. Mice were randomly allocated to the following groups: vehicle control (physiological saline, 0.9% NaCl), chlorogenic acid (20 mg/kg in saline), diazepam (1 mg/kg in saline), flumazenil was applied at dose 5 mg/kg administered in combination with chlorogenic acid at 20 mg/kg (group: Chl+Flu) and diazepam at 1 mg/kg (group: Dzp+Flu).

2.2.3. Free exploratory test

The apparatus consisted of a polyvinyl chloride box (30×20×20 cm) covered with plexiglas and subdivided into

six equal exploratory units which were all interconnected by small doors. It could be divided in half lengthwise by means of closing three temporary partitions. Mice were naive to the apparatus and had no previous drug treatment. The apparatus was kept on the floor in a room next to the mouse room. Approximately 24 h before testing, each subject was placed in one half of the apparatus with the temporary partitions in place in order to become accustomed to the environment. The floor of this half was covered with sawdust and the animal was given unlimited access to food and water. After removing the temporary partition at the beginning of the observation for 10 min, the experimenter left the room and the behavior of each mouse was recorded with a video camera under red light. The number of rears made by the animal (rears), the number of units entered (locomotion), time spent in the novel area and the number of transitions from the familiar to the novel environment were recorded. Drugs were administered intraperitoneally 30 min before testing. Ten animals per group were used for each drug. All doses were administered in a volume of 10 ml/kg. Mice were randomly allocated to the following groups: vehicle control (physiological saline, 0.9% NaCl), chlorogenic acid (20 mg/kg in saline), diazepam (1 mg/kg in saline).

2.3. Cellular assay of antioxidant activity of chlorogenic acid

We used flow cytometry to separate different immune cells populations by size (forward light scatter, FSC) and relative granularity (side light scatter, SSC). FSC and SSC were used after excitation of immune cells with a 488 nm laser beam of argon. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was measured in the granulocytes by monitoring of the emitted fluorescence by these cells (FACS-Scan, Becton-Dickinson, Immunofluorometry Systems, France).

Mice were anaesthetized with the halothane and sacrificed. Collected blood was heparinized and dispatched in volumes of 100 μ l in Eppendorff tubes. Erythrocyte lysis was done using 2 ml of lysing solution in each tube; the whole was placed in darkness during 10 min. After centrifugation at 4 °C (5 min; 2000 rpm), the supernatant was eliminated. Then 2 ml of cell wash solution was added to sediment containing white cells, mixed and followed by a new centrifugation in the same conditions. Supernatant was still eliminated.

Three groups of cells belonging to the same blood were used to assess intracellular ROS level; one was a control without oxidative stress, the second one a control with oxidative stress and the third group served to evaluate the antioxidant activity of chlorogenic acid.

We added to white blood cells sediment obtained by centrifugation 1 ml of the HBSS buffer and 5 μ l of DCFH-DA (50 μ M). For the first control (without oxidative stress); incubation was achieved in darkness during 30 min at 37 °C. For the second control (with oxidative stress); incubation

was performed in darkness during 15 min at 37 °C, after we added 5 μ l of H₂O₂ (89 mM) to provoke oxidative stress, then the incubation was continued for 15 min more. In the third group of cells, chlorogenic acid (0.5 mg/ml) was used for the evaluation of its antioxidant activity. Vitamin C (0–0.15 mg/ml) was also used for calibration of a standard curve in order to compare antioxidant activity of chlorogenic acid with the antioxidant of reference, vitamin C. So, to this group of cells we added in addition to HBSS buffer and DCFH-DA, 5 μ l of chlorogenic acid or vitamin C. After 15 min of incubation in darkness we induced the oxidative stress by addition of 5 μ l of H₂O₂ (89 mM). The incubation was continued for 15 min at 37 °C. As soon as incubation times were completed, the ROS levels were measured by the flow cytometry technique.

The percentage reduction of ROS generated in granulocytes by exogenous H₂O₂ was calculated by monitoring of the emitted fluorescence intensity (FI) by these cells using the following relation: $[1 - (FI_1 - FI_0)/(FI_s - FI_0)] \times 100$.

Where FI_s is the fluorescence intensity of control with oxidative stress, FI₁ is the fluorescence intensity of pre-treated cells and FI₀ is the fluorescence intensity of control without oxidative stress.

2.4. Statistical analysis

Non-parametric statistical analysis was done for behavioral data that did not follow Gaussian distribution. Quantitative results were analyzed using Kruskal–Wallis test as a between-group variable, followed by Mann–Whitney *U* test to compare the treated groups to control one. Behavioral data with a Gaussian distribution were analyzed by ANOVA followed by PLSD of Fisher. Data are reported as mean \pm SEM. Level of significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were carried out using the Statview® 4.5 statistical package (Abacus Concepts, Inc).

3. Results

3.1. Light/dark choice test

ANOVA revealed significant differences between groups of mice with respect to latency time ($F(5,50)=2.59$; $p=0.03$), number of transitions ($F(5,50)=3.11$; $p=0.01$), time in the lit box ($F(5,50)=2.59$; $p=0.03$), locomotion in the lit box ($F(5,50)=7.39$; $p<0.0001$) and total locomotion ($F(5,50)=2.94$; $p=0.02$). There were no significant differences between groups with respect to locomotion in the dark box ($F(5,50)=0.69$; $p>0.05$) (Fig. 2).

Mice administered chlorogenic acid (Chl) at 20 mg/kg and diazepam (Dzp) at 1 mg/kg took significantly less time to leave the dark box ($p<0.05$), had significantly more transitions ($p<0.01$), spent significantly more time in the lit box ($p<0.01$; $p<0.05$, respectively) and displayed significantly more locomotion in the lit box ($p<0.001$; $p<0.01$, respectively) than control mice (NaCl, 0.9%). For

Light/dark test

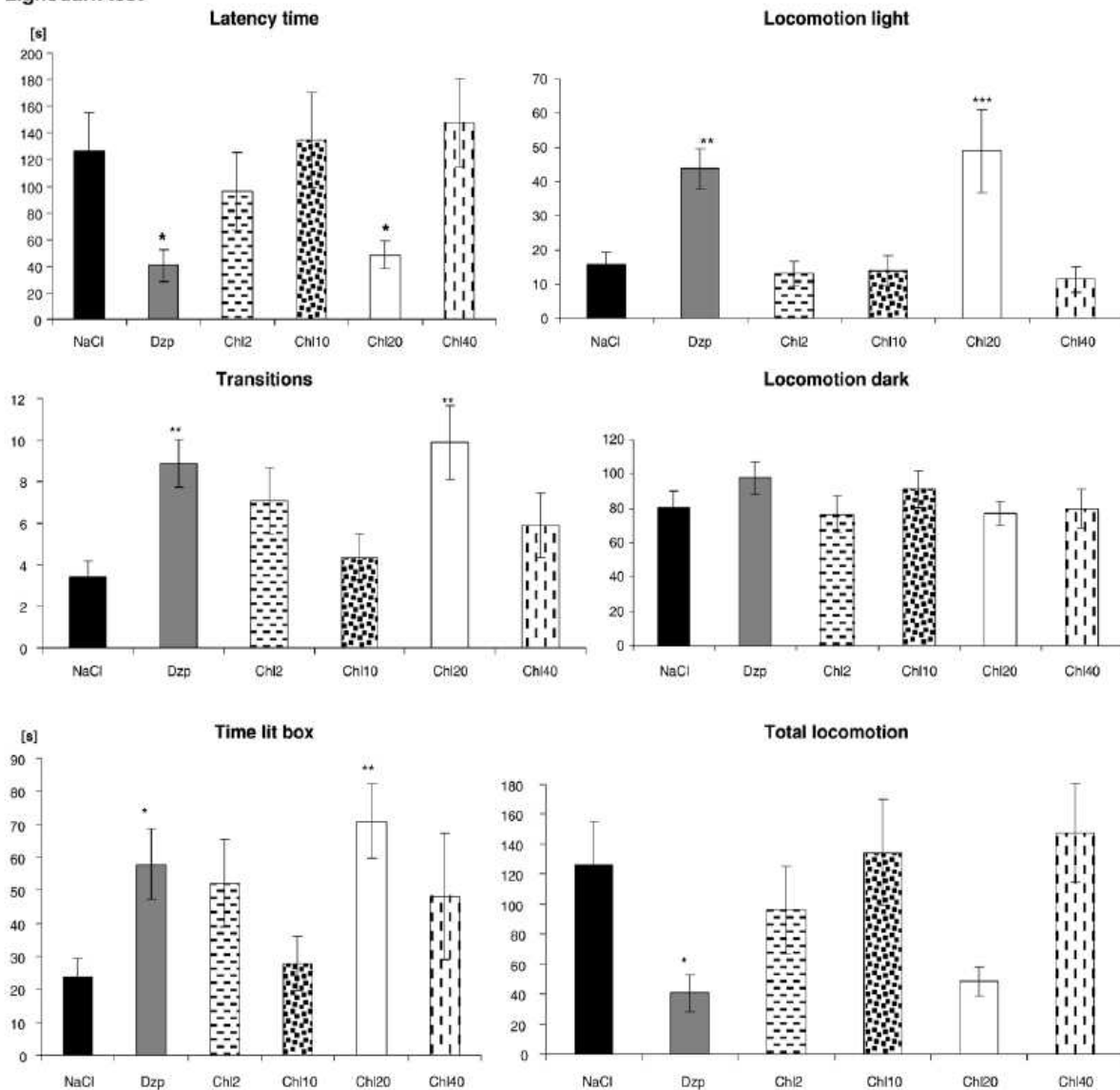


Fig. 2. Effects of intraperitoneal administration of chlorogenic acid at 2, 10, 20 and 40 mg/kg (Chl) and diazepam at 1 mg/kg (Dzp) compared to control (NaCl) on the behavior of Swiss mice in light/dark choice test. Data represent mean±SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

locomotion total, only mice administered diazepam (Dzp) exhibited significant differences compared to control ($p < 0.05$). Chlorogenic acid at doses 2, 10 and 40 mg/kg had no effect on the behavior observed ($p > 0.05$).

3.2. Elevated plus maze

The Kruskal–Wallis test revealed significant differences between groups with respect to percentage of entries ($H = 11.2$; $p = 0.024$) and time spent in the open arms ($H = 10.29$; $p = 0.03$). There were no significant differences

between groups with respect to closed arms entries ($H = 7.11$; $p > 0.05$) (Fig. 3).

Mice administered chlorogenic acid (Chl) at 20 mg/kg and diazepam (Dzp) at 1 mg/kg spent significantly more time in the open arms ($p < 0.01$) and made significantly more entries into open arms ($p < 0.05$) versus control. The Mann–Whitney U test did not reveal any significant differences between controls and the group of mice administered chlorogenic acid at 20 mg/kg plus flumazenil at 5 mg/kg (Chl+Flu), or mice administered diazepam at 1 mg/kg plus flumazenil at 5 mg/kg (Dzp+Flu) with respect to the

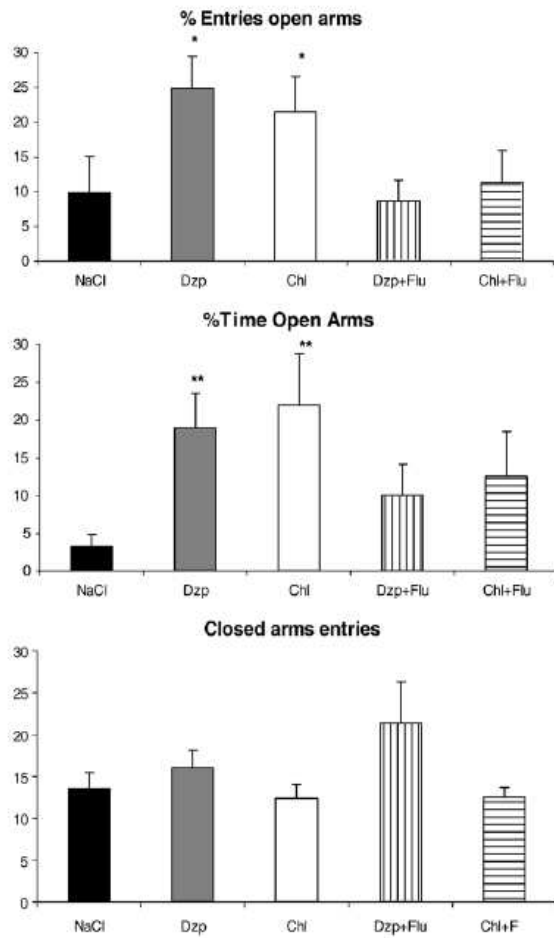


Fig. 3. Effects of intraperitoneal administration of chlorogenic acid at 20 mg/kg (Chl), diazepam at 1 mg/kg (Dzp) and administration in combination of both chlorogenic acid (20 mg/kg) and flumazenil at 5 mg/kg (Chl+Flu), and diazepam (1 mg/kg) and flumazenil at 5 mg/kg (Dzp+Flu) compared to saline (NaCl) on the behavior of Swiss mice in elevated plus maze. Data represent mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

percentage of entries ($p > 0.05$) and time spent in the open arms ($p > 0.05$).

3.3. Free exploratory test

ANOVA revealed significant differences between groups with respect to the number of rears ($F(2,26) = 4.15$; $p = 0.02$), locomotion ($F(2,26) = 9.93$; $p = 0.0006$) and transitions ($F(2,26) = 5.94$; $p = 0.007$). There were no significant differences between groups with respect to time spent in the novel space ($F(2,26) = 1.53$; $p > 0.05$) (Fig. 4).

Mice administered chlorogenic acid (Chl) at 20 mg/kg and diazepam (Dzp) at 1 mg/kg displayed significantly more rearing behavior ($p < 0.05$), locomotion ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively) and transitions from the familiar to unfamiliar compartment ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively) than control mice (NaCl 0.9%).

3.4. Cellular assay of antioxidant activity of chlorogenic acid

The ROS level was detected using a fluorescence probe, 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), which could be oxidized to highly fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by intracellular ROS [16]. We found (Fig. 5) a decrease of fluorescence intensity (FI) from (B) corresponding to control

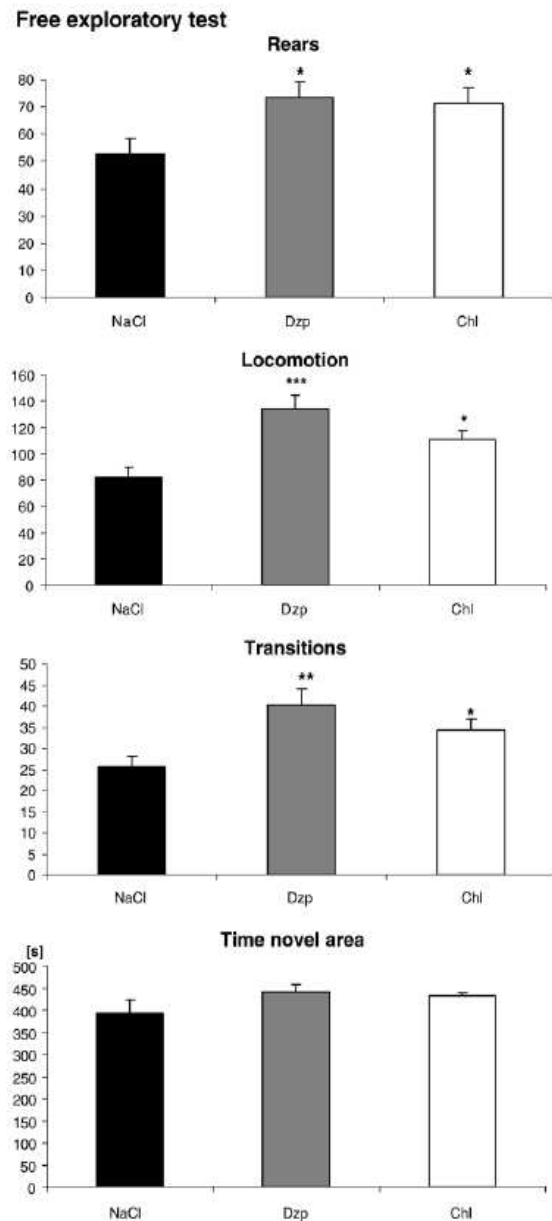


Fig. 4. Effects of intraperitoneal administration of chlorogenic acid at 20 mg/kg (Chl) and diazepam at 1 mg/kg (Dzp) compared to saline (NaCl) on the behavior of Swiss mice in free exploratory test. Data represent mean ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

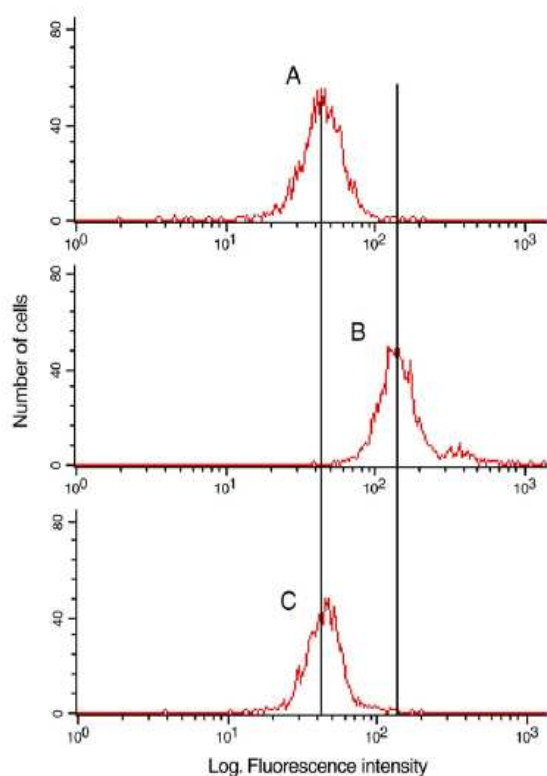


Fig. 5. The ROS levels were measured by flow cytometry. The fluorescence intensity was expressed as decimal logarithm versus the cell number. (A) and (B): Controls corresponding to level of intracellular ROS without and with oxidative stress, respectively. (C): Pre-treated granulocytes corresponding to ROS level in these cells incubated in presence of chlorogenic acid at 0.5 mg/ml, then subject to the oxidative stress.

with oxidative stress to (C) representing the pre-treated cells. This decrease is due to chlorogenic acid effect on ROS level which is directly correlated with FI. The scavenger capacity of chlorogenic acid for ROS using cellular assay of antioxidant activity was highlighted. At 0.5 mg/ml of chlorogenic acid, we observed a reduction of $83.21 \pm 6.21\%$ of ROS level generated by exogenous H_2O_2 . In addition, the antioxidative effect of chlorogenic acid against ROS was evaluated in comparison with vitamin C used as a standard, and thus expressed as vitamin C equivalent (VCE). Therefore, we found that 0.5 mg of chlorogenic acid corresponds to 0.12 ± 0.003 mg VCE.

4. Discussion

Chlorogenic acid was tested at several doses in the light/dark test, and its dose–response curve appeared to have an inverted U-shape: 20 mg/kg was active, but 2, 10 and 40 mg/kg were not (Fig. 2). The well-known anxiolytic diazepam at 1 mg/kg and chlorogenic acid at 20 mg/kg caused a similar spectrum of behavioral change compared to the vehicle (NaCl 0.9%). Both molecules increased the number of transitions from the dark to the lit box, the cumulative time

spent in the lit box and locomotor activity in the lit box. The only difference was that diazepam exhibited significant difference than control group (NaCl) with respect to total locomotion. Moreover, both molecules decreased latency time (latency of the first crossing from the dark to the lit box). The exploratory behavior of mice in the light/dark test is based on preference of these rodents toward two-compartment box, where one chamber is brightly lit and the other dark. In such conditions, mice have a clear preference for the dark side of the box [17]. Therefore, latency time, number of transitions between the two boxes and time spent in the lit box were used as parameters to evaluate anxiety levels. According to effects obtained on anxiety-related behavior in mice at dose 20 mg/kg (Fig. 2), our results suggest that chlorogenic acid displays an anxiolytic-like effect.

In order to confirm the anti-anxiety effect of the active dose of chlorogenic acid (20 mg/kg) a second animal model of anxiety, the elevated plus maze, was employed. To explore the mechanism mediating the anxiolytic properties of chlorogenic acid, the flumazenil (benzodiazepine receptor antagonist) was used [18]. Commonly, anxiolytic drugs increase both the time spent by the rodents and their entries into open arms. These measures are used as indices of anxiolytic activity since the elevated plus maze test of anxiety is based on the natural aversion of rodents for high and open spaces [18]. The elevated plus maze test indicated that the pharmacological profile of chlorogenic acid at 20 mg/kg was similar to that induced by diazepam, a well-known benzodiazepine agonist (Fig. 3). These molecules did not affect locomotor activity, since no significant differences occurred in the number of entries into closed arms versus control mice. With respect to the cumulative time spent in the open arms and the total number of visits to the open arms, both molecules diazepam (1 mg/kg) and chlorogenic acid (20 mg/kg) exhibited a significant increase versus control. These results confirm the anxiolytic-like effect of chlorogenic acid.

No significant differences between control, group (Chl+Flu), and group (Dzp+Flu) with respect to the percentage of entries and the time spent in open arms ($p > 0.05$). Previously behavioral tests achieved in our laboratory showed that flumazenil alone not affects the behavioral activity (results not shown). Our results clearly showed that the anti-anxiety effect of chlorogenic acid was blocked by flumazenil suggesting that this polyphenol reduces anxiety by activating the benzodiazepine receptor. Recently, it has been reported that (–)-epigallocatechin gallate (a polyphenol) produces some behavioral effects corresponding to a benzodiazepine-like *i.e.*, an anxiolytic effect which could result from an interaction with GABA_A receptors [19]. Our observations of an antagonist effect of flumazenil on chlorogenic acid suggest that this polyphenol acts as a benzodiazepine receptor agonist. This abolishes the hypothesis that chlorogenic acid acts on anxiety by its antioxidant potential. However, the mechanism of the interaction of

some polyphenols including chlorogenic acid with GABA_A receptors remains unknown.

We explored the effects of chlorogenic acid on trait anxiety using the free exploratory test (Fig. 4). Belzung et al. [20] reported that drugs which bind in a non-selective manner to benzodiazepine recognition sites, such as chlordiazepoxide and diazepam were able to abolish neophobia in Balb/c mice. We observed no significant differences between control, group of diazepam (Dzp) and group of chlorogenic acid (Chl) with respect to the cumulative time spent in the novel area. While both molecules diazepam (1 mg/kg) and chlorogenic acid (20 mg/kg) exhibited a significantly increase of exploratory activity (rears and locomotion) and provoked a significantly increase with respect to the number of transitions from the familiar to the novel environment compared to control mice. These results showed that diazepam and chlorogenic acid caused a similar spectrum of behavioral change reducing trait anxiety in mice.

The antioxidant activity of chlorogenic acid has been investigated in different models (ABTS, DPPH and ORAC assays) [21,22]. However, due to the absence of information on the scavenger activity for ROS in biological medium we tested chlorogenic acid against ROS in living cells. On the other hand, most of the work *in vitro* with polyphenols have been carried out on neuronal cells, but very little is known about their cytoprotective activity on immune cells. Oxidative stress of blood granulocytes has been observed in several diseases such as hypertension [23] and type 2 diabetes [24]. In mice with high level of anxiety, we have found in their blood granulocytes an elevated oxidative status compared with mice with intermediate anxiety (moderately-anxious) and non-anxious mice [6]. Pre-treatment of granulocytes with chlorogenic acid appreciably inhibited the ROS generation induced by H₂O₂ (Fig. 5). Alternatively, a possible direct scavenging of H₂O₂ by chlorogenic acid during the incubation period cannot be ruled out. In this study, the protective effect of chlorogenic acid on blood granulocytes from oxidative stress was observed. Our results show that vitamin C protected blood granulocytes from oxidative stress in a manner more effective than chlorogenic acid since 0.5 mg of chlorogenic acid corresponds to 0.12±0.003 mg VCE. It has been reported that chlorogenic acid is absorbed with no structural change in the small intestine [25]. Therefore, we conclude that the pharmacological activities displayed by chlorogenic acid are very interesting and have health-promoting advantages. Because it exhibits a protective effect on granulocytes from oxidative stress; moreover this antioxidant activity is coupled with anxiolytic-like effects, and finally chlorogenic acid is one of the most abundant polyphenols in the human diet such as plums, apples and cherries.

Acknowledgements

We are grateful to Pr. Didier Desor (Neurosciences, URAFPA, Université Henri Poincaré, Nancy) for helpful

discussions and to Frédéric Desor for his technical assistance.

References

- [1] Hovatta L, Tennant RS, Helton R, Marr RA, Singer O, Redwine JM, et al. Glyoxalase 1 and glutathione reductase 1 regulate anxiety in mice. *Nature* 2005;438:662–6.
- [2] Krömer SA, Keßler MS, Milfay D, Birg IN, Bunck M, Czibere L, et al. Identification of glyoxalase-I as a protein marker in a mouse model of extremes in trait anxiety. *J Neurosci* 2005;25(17):4375–84.
- [3] Ditzgen C, Jastorff AM, Keßler MS, Bunck M, Tepytska L, Erhardt A, et al. Protein biomarkers in a mouse model of extremes in trait anxiety. *Mol Cell Proteomics* 2006;5:1914–20.
- [4] Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Ustundag B, Bulut S. Antioxidant enzyme and malondialdehyde levels in patients with panic disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46:186–9.
- [5] Kuloglu M, Atmaca M, Tezcan E, Gecici O, Tunckol H, Ustundag B. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels in patients with obsessive-compulsive disorder. *Neuropsychobiology* 2002;46:27–32.
- [6] Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R. Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* accepted for publication.
- [7] Kim DO, Jeong SW, Lee CY. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem* 2003;81:321–6.
- [8] Kim DO, Heo HJ, Kim YJ, Yang HS, Lee CY. Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *J Agric Food Chem* 2005;53:9921–7.
- [9] Crawley JN. Neuropharmacologic specificity of a simple animal model for the behavioural actions of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1981;15:695–9.
- [10] Misslin R, Belzung C, Vogel E. Behavioural validation of a light/dark choice procedure for testing anti-anxiety agents. *Behav Processes* 1989;18:119–32.
- [11] Lister RG. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. *Pharmacol Ther* 1990;46:321–40.
- [12] Belzung C, Le Pape G. Comparison of different behavioural test situations used in psychopharmacology for the measurement of anxiety. *Physiol Behav* 1994;56:623–8.
- [13] Rodgers RJ, Dalvi A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci Biobehav Rev* 1997;21:801–10.
- [14] Belzung C, Berton F. Further pharmacological validation of the BALB/c ByJ neophobia in the free exploratory paradigm as an animal model of trait anxiety. *Behav Pharmacol* 1997;8:541–8.
- [15] Griebel G, Belzung C, Misslin R, Vogel E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drugs. *Behav Pharmacol* 1993;4:637–44.
- [16] Hong H, Liu GQ. Protection against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity in PC12 cells by scutellarin. *Life Sci* 2004;74:2959–73.
- [17] Crawley JN, Goodwin FK. Preliminary report of a single animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13:167–70.
- [18] Schmidt-Mutter C, Pain L, Sandner G, Gobaille S, Maitre M. The anxiolytic effect of g-hydroxybutyrate in the elevated plus maze is reversed by the benzodiazepine receptor antagonist, flumazenil. *Eur J Pharmacol* 1998;342:21–7.
- [19] Vignes M, Maurice T, Lanté F, Nedjar M, Thethi K, Guiramand J, et al. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res* 2006;1110:102–15.
- [20] Belzung C, Pineau N, Beuzen A, Misslin R. PD135158, a CCK-B antagonist, reduces “state”, but not “trait” anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1994;49:433–6.

- [21] Kim DO, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J Agric Food Chem* 2002;50:3713–7.
- [22] Kayano SI, Kikuzaki H, Fukutsuka N, Takahiko M, Nakatani N. Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica* L.) constituents and a new synergist. *J Agric Food Chem* 2002;50:3708–12.
- [23] Yasunari K, Maeda K, Nakamura M, Yoshikawa J. Oxidative stress in leukocytes is a possible link between blood pressure, blood glucose, and C-reacting protein. *Hypertension* 2002;39:777–80.
- [24] Pitozzi V, Giovannelli L, Bardini G, Rotella CM, Dolara P. Oxidative DNA damage in peripheral blood cells in type 2 diabetes mellitus: higher vulnerability of polymorphonuclear leukocytes. *Mutat Res* 2003;529:129–33.
- [25] Azuma K, Ippoushi K, Nakayama M, Ito H, Higashio H, Terao J. Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *J Agric Food Chem* 2000;48:5496–500.

Article de synthèse

Ethnopharmacologie

Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Cichorium intybus* L.

H. Rammal¹, C. Younos¹, J. Bouayed¹, A. Chakou², S. Bedouhene², R. Soulimani¹

¹Ethnobotanique et pharmacologie/Anxiété, stress oxydant et bioactivité, université Paul-Verlaine de Metz, BP 4102, F-57040 Metz Cedex 01, France

²CRD, Groupe Sidal, BP 09F, Mohammadia, Alger, Algérie

Correspondance : e-mail : soulimani@univ-metz.fr

Ethnobotanique

Cichorium intybus connu sous plusieurs noms vernaculaires, dont la chicorée sauvage, la chicorée amère, est une plante de la famille des Asteraceae, appartenant au genre *Cichorium*, cultivée soit pour ses feuilles (salades, endives), soit pour ses racines (succédané de café). Cette plante était mentionnée en 4000 avant Jésus-Christ sur les papyrus égyptiens. D'après Carr et al. [4], en Égypte, la chicorée était déjà cultivée sur le bord du Nil. Selon Zohary [34], une autre espèce, *Cichorium pumilum* Jacq., était connue des Hébreux et mentionnée dans la Bible. Mais d'après Duke [8], la plante citée dans la Bible n'est que *Cichorium intybus* L.

C'est une plante herbacée, plus ou moins pubescente, vivace, de 50 cm à 1 m de haut, très commune dans les prés, les champs incultes, elle se rencontre fréquemment sur les bords de chemins, les terrains caillouteux. On peut la trouver jusqu'à 1 500 m d'altitude. Elle est originaire d'Europe, d'Asie et d'Afrique du Nord et cultivée en Amérique du Nord. Elle présente des feuilles basales profondément découpées, des feuilles intermédiaires entières lancéolées, embrassant la tige, et des feuilles supérieures réduites à des bractées. Les inflorescences sont des fleurs ligulées, bleues et groupées en capitules. Les feuilles apparaissent à l'automne et dessèchent à floraison en juillet/août. Les fruits (akènes), surmontés d'une couronne de poils (pappus), ont une saveur très amère (latex). La racine est pivotante. Les tiges sont rigides, anguleuses, faisant apparaître du latex à la cassure, très peu feuillées, cannelées de 50 cm à 1 m de hauteur, à rameaux raides, divergents, pubescents, elles paraissent au mois de juillet, en même temps que les rosettes se dessèchent, et bientôt elles se couvrent de fleurs d'un bleu céleste. Toutes les parties de la plante sont amères. C'est

aussi une plante fourragère. Les fleurs s'ouvrent vers 6 heures et se referment vers midi.

La chicorée était également cultivée dans le Khorassan (aujourd'hui partagé entre l'Iran et l'Afghanistan). Selon Qassem bin Yussuf Abu Nasri Herawi [26], elle se cultive entre février et mars, elle a besoin d'un arrosage régulier et d'un engrais animal. On sèche ses racines à l'ombre.

Parties utilisées : Racines et feuilles.

Utilisations traditionnelles

Cichorium intybus L. est une plante médicinale à propriétés stomachique, dépurative et légèrement laxative. C'est la racine qui est utilisée en pharmacie. Elle contient de l'inuline (glucide de réserve), ainsi que de l'intybine, substance amère. Les Romains et les Grecs utilisaient les feuilles de cette plante pour fortifier l'estomac. Chevalier [5] indique que, selon Pline (23-79 avant Jésus-Christ), le jus de la plante mélangé à l'eau de rose et au vinaigre [7] était employé contre les maux de tête.

La chicorée appelée en persan "kasni" ou "kashni" était également connue et utilisée dans la médecine traditionnelle islamique. Avicenne [2], sous le nom "hindbâ", présente ses formes sauvages et cultivées. Selon Avicenne, la chicorée et la laitue sont des plantes de la même famille, mais elles ne possèdent pas les mêmes propriétés. Dans la médecine islamique, la décoction des feuilles était préconisée dans le traitement des maux de gorge et celle des racines contre la fièvre.

Cette plante est employée dans la médecine traditionnelle [12], avec très peu d'indications sur son activité antibactérienne [13, 22]. *Cichorium intybus* L. est un antioxydant fort [29], peut être employé pour une meilleure digestion et est doté de propriétés diurétiques et antalgiques [31]. Selon la thérapeutique traditionnelle de l'Inde, la plante a des propriétés toniques [7].

Cichorium intybus a une longue histoire de son utilisation et est particulièrement de grande valeur pour ses effets toniques sur le foie et sur l'appareil digestif. La racine et les feuilles sont apéritives, cholagogues, dépuratives, digestives, diurétiques, hypoglycémiques, laxatives et toniques. Une décoction de la racine a été employée dans le traitement de l'ictère (jaunisse), de l'hypertrophie, de la goutte et du rhumatisme [24].

Phytochimie

La racine de *Cichorium intybus* contient plus de 40 % d'inuline, des tannins, des pectines. La fleur contient la cichoriine [28]. Le goût amer bien connu de la chicorée est associé à la présence des lactones de sesquiterpène [16], des lactones sesquiterpénique type guaïanolides (lactucine, lactucopicrine, 8-déoxylactucine et 11- β , 13-dihydroxylactucine) [21, 23, 25, 27, 30, 32, 33], phytoalexine [18], des stérols et polyamines [17] des composés phénoliques (esculetine) [9], des coumarines [15], des anthocyanes [19].

Pharmacologie

Des études ont montré que la plante a un effet anti-hépatotoxique [1, 6, 9]. L'extrait alcoolique de *Cichorium intybus* est employé pour traiter la pyorrhée ou l'inflammation gingivale [20]. Les extraits aqueux et alcooliques ont montré une activité anti-inflammatoire contre l'œdème induit à la formaline. Il est aussi rapporté qu'elle a une action semblable à la quinidine sur le cœur isolé [11].

L'extrait aqueux possède des propriétés analgésiques et sédatives aux doses de 15 et 30 mg/kg, comparables à l'ibuprofène (30 mg/kg) [33], antimalariales [3] ; ainsi que gastroprotectives [10].

L'extrait hydrosoluble de la chicorée s'est avéré pour réduire la prise de glucose du jéjunum perfusé chez les rats normaux [14].

L'extrait éthanolique de la chicorée réduit le taux de glucose, triglycérides et cholestérol dans le sang chez les rats [24].

Toxicité

Comestible, pas de toxicité à dose normale.

Bibliographie

- Ahmed B, Al-Howiriny TA, Siddiqui Abu B (2003) Antihepatotoxic activity of seeds of *Cichorium intybus*. *J Ethnopharmacol* 87(2-3): 237-40
- Avicenne (Abū Ali ibn Sīnā) (1986) *Al-Qānūn fit-Tibb* (Canon de la médecine), traduction persane par Abdulrahman Sharaf-kandi. Ed. Soroch, Teheran, Iran, 2t
- Bischoff TA, Kelley CJ, Karchesy Y, et al. (2004) Antimalarial activity of Lactucin and Lactucopicrin: sesquiterpene lactones isolated from *Cichorium intybus* L. *J Ethnopharmacol* 95(2-3): 455-7
- Carr A, Cassidy C, Cohen E, et al. (1987) *Rodale's Illustrated Encyclopedia of Herbs*. Ed. Rodale Press, Emmaus, Pennsylvania, États-Unis
- Chevalier A (1996) *The encyclopedia of medicinal plants* GRB ED. Milan, Italie
- Chhaya G, Mishra SH (1997) Antihepatotoxic activity of *Cichorium intybus*. *J Ethnopharmacol* 58: 131-4
- Chopra RN, Chopra IC, Hand KL (1996) *Indigenous Drugs of India*, Academic Publishers, Calcutta
- Duke JA (1983) *Medicinal plants of the Bible*, Ed. Trado medic bouks, owerri, New York, Londres
- Gilani AH, Janbaz KH, Shah BH (1998) Esculetin prevents liver damage induced by paracetamol and CCL4. *Pharmacol Res* 37(1): 31-5
- Gürbüz I, Üstün O, Yesilada E, et al. (2002) In vivo gastroprotective effects of five Turkish folk remedies against ethanol-induced lesions. *J Ethnopharmacol* 83: 241-4
- Jindal MN, Patel VK, Patel NB (1975) Pharmacological actions of aqueous and alcoholic extracts of roots of *C. intybus* Linn. *Indian J Pharmacol* 7: 24-33
- Josifovic M (1975) *Flora of Socialist Republic of the Serbia*. Beograd (eds): SANU, p. 266 (1-465)
- Kelet O, Bakýrel T, Ak S, Alpmar A (2001) The antibacterial activity of some plants used for medicinal purposes against pathogens of veterinary importance. *Folia Veterinaria* 45(1)
- Kim M, Shin HK (1998) The water-soluble extract of chicory influences serum and liver lipid concentrations, cecal short-chain fatty acid concentrations and fecal lipid excretion in rats. *J Nutr* 128: 1732-6
- Kisiel W, Michalska K (2002) A new coumarin glucoside ester from *Cichorium intybus*. *Fitoterapia* 73(6): 544-6
- Kraker JW, Franssen MCR, Dalm MCF, et al. (2001) Biosynthesis of Germacrene A Carboxylic Acid in Chicory Roots. Demonstration of a Cytochrome P450 (+)-Germacrene A Hydroxylase and NADP⁺-Dependent Sesquiterpenoid Dehydrogenase(s) Involved in Sesquiterpene Lacton Biosynthesis. *Plant Physiol* 125: 1930-40
- Krebsky EO, Geuns JMC, De Proft M (1999) Polyamines and sterols in *Cichorium* heads. *Phytochemistry* 50(4): 549-53
- Monde K, Oya T, Shirata A, Takasugi M (1990) A guaïanolide phytoalexin, chichoralixin, from *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* 29(11): 3449-51
- Norbæk R, Nielsen K, Kondo T (2002) Anthocyanins from flowers of *Cichorium intybus*. *Phytochemistry* 60(4): 357-9
- Patel VK, Bhatt HV (1985) Toxicity and antiseptic effects of chicory root extracts in Pyorrhoea. *Antiseptic* 31: 904-6
- Peters AM, Van Amerongen A (1998) Relationship between levels of sesquiterpene lactones in chicory and sensory evaluation. *J Am Soc Hortic Sci* 123: 326-9
- Petrovic J, Stanojkovic A, Comic LJ, Curcic S (2004) Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. *Fitoterapia* 75(7-8): 737-9
- Price KR, Du Pont MS, Shepherd R, et al. (1990) Relationship between the chemical and sensory properties of exotic salad crops-coloured lettuce (*Lactuca sativa*) and chicory (*Cichorium intybus* L.). *J Sci Food Agric* 53: 185-92
- Pushparaj PN, Low HK, Manikandan J, et al. (2007) Anti-diabetic effects of *Cichorium intybus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 111(2): 430-4
- Pyrek JS (1985) Sesquiterpene lactones of *Cichorium intybus* and *Leontodon autumnalis*. *Phytochemistry* 24: 186-8
- Qassem bin Yussof Abu Nasri Herawi (1968) *Irshad al-Zeraa*. Ed. Presse universitaire, Téhéran, Iran. Texte persan du x^e siècle
- Rees SB, Harborne JB (1985) The role of sesquiterpene lactones and phenolics in the chemical defence of the chicory plant. *Phytochemistry* 24: 2225-31
- Saric MR (1989) *Medicinal Plants of SR Serbia*. Serbian Academy and Arts, Belgrade, p. 152
- Saroja S, Padilla PR, Radha P, Thilagavathy P (2004) Enzymic and non-enzymic antioxidants in *Cichorium intybus*. Cité dans Petrovic J,

- Stanojkovic A, Comic Lj, Curcic S (2004) Antibacterial activity of *Cichorium intybus*. *Fitoterapia* 75(7-8): 737-9
30. Seto M, Miyase T, Umehara K, et al. (1988) Sesquiterpene lactones from *Cichorium endivia* L. and *C. intybus* L. and cytotoxic activity. *Chem Pharm Bull* 36: 2423-9
31. Tucakov J (1997) *Phytotherapy* (20^e éd.). The Publishing House "Rad", Belgrade, p. 279
32. Van Beek TA, Maas P, King BM, et al. (1990) Bitter sesquiterpene lactones from chicory roots. *J Agric Food Chem* 38: 1035-8
33. Wesolowska A, Nikiforuk A, Michalska K, et al. (2006) Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. *J Ethnopharmacol* 107(2): 254-8
34. Zohary M (1982) *Plants of the Bible*, Cambridge university Press. Cambridge, London, New York, New Rochelle

Ethnobotanique

Matière médicale internationale

Notes ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Hippophae rhamnoides* L.

H. Rammal¹, C. Younos¹, J. Bouayed¹, F. Desor¹, A. Chakou², T. Derouich², R. Soulimani¹

¹ Ethnobotanique et pharmacologie/anxiété, stress oxydant et bioactivité, Université Paul-Verlaine de Metz, BP 4102, 57040 Metz Cedex 01, France

² CRD, groupe SAIDAL, BP 09F, Mohammadia, Alger, Algérie

Correspondance : e-mail : rachid.soulimani@univ-metz.fr

Ethnobotanique

Hippophae rhamnoides est un arbrisseau sauvage épineux de la famille des Éléagnacées, assez commun en Europe et en Asie. C'est une espèce dioïque connue sous plusieurs noms vernaculaires dont l'anas de Sibérie, l'argousier, le saule épineux, le faux nerprun, la bourdaine marine, l'argasse, le grisset, l'épine luisante, l'olivier de Sibérie. En anglais, cette plante s'appelle *sea buckthorn* et en chinois *star-bu* (nom tibétain). C'est un arbrisseau très épineux, au port buissonnant, de 2 à 3 mètres de haut, il peut prendre parfois le port d'un arbuste et atteindre jusqu'à 6 mètres. Les feuilles, caduques, alternes, simples, sont très étroites et présentent une seule nervure. Le pétiole est très court. Le limbe est vert à la face supérieure, et gris argenté à la face inférieure. Les fleurs, apétales, très petites, sont verdâtres et apparaissent dès le mois d'avril, avant les feuilles. Les sexes sont séparés (plante dioïque). Les fruits, de forme ovoïde, sont complexes (fausses drupes), formés d'un akène entouré d'une partie charnue issue de la transformation du réceptacle floral. Extérieurement, ils sont jaune orangé à maturité (vers le mois de septembre) et mesurent de 6 à 8 mm de long. Cette espèce est spontanée dans les régions tempérées de l'Eurasie.

Parties utilisées

Les baies, les pépins et les feuilles.

Utilisations traditionnelles

Hippophae rhamnoides L., connue sous le nom de *shaji* (appellation chinoise), est traditionnellement employée pour traiter la contusion et l'œdème et comme anti-coagulant [9].

Les fruits, bien que très acides et astringents, sont comestibles sous forme de confiture, de compote ou de

gelée. Ils servent de condiments dans les pays nordiques, la plante présente un intérêt horticole comme arbrisseau d'ornement. C'est une plante améliorante des sols grâce à la présence dans ses racines de nodosités hébergeant des bactéries capables de fixer l'azote atmosphérique.

L'argousier a plusieurs applications médicinales, notamment contre les brûlures et blessures cutanées. L'huile d'argousier est également utilisée par l'industrie cosmétique.

Phytochimie

Il a été mis en évidence des phytostérols dans l'argousier (campestérol, clerostérol, lanostérol, sitostérol amyryne, sitostanol 5-avenastérol 24(28)-stigmasta-en-ol ; 5,24(25)-stigmastadiénol, lupéol, gramistérol 7-sitostérol, cycloarténol, cycloeucalénol 7-avenastérol, 28-méthyllobtusifoliol, 24-méthylencycloartanol, érythrodiol, citrostadiénol, uvaol, et aldéhyde d'oléanol. Les sitostérol et 5-avenastérol sont majoritaires [11], les graines contiennent des catéchines (épigalocatéchine), des procyanidines dont la prodelphinidine est le composé principal [3] et des flavonoïdes (isorhamnétine) [6, 16].

Pharmacologie

Des travaux ont mis en évidence les activités anti-oxydantes et anti-microbiennes [12], anti-inflammatoires [4] anticancéreuses [13, 17, 22]. Cette plante peut soulager la douleur et aider à la guérison des brûlures [18], elle pourrait avoir une action bénéfique sur la viscosité du sang et sur la fonction cardiaque en général [15]. Les flavonoïdes de l'argousier sont des constituants bioactifs, ils supprimeraient l'agrégation de plaquette [10], soulagent les maladies cardiaques [23] et ont un pouvoir anti-oxydant, hépatoprotecteur [5], ils réduisent le taux de cholestérol

chez des rattes ménopausées [21], ainsi que des propriétés immunomodulatrices [1, 7, 8, 16, 19].

Les flavonoïdes de l'argousier ont été identifiés pour être responsables de la plupart de ses activités pharmacologiques. Des flavones totales, des rhamnoïdes, principalement comprenant la quercétine, l'isorhamnétine et le kaempférol [20] qui sont également efficaces dans la suppression de l'hypersensibilité [2]. D'autres travaux ont montré des effets anti-inflammatoires chez l'animal, par la réduction de la perméabilité vasculaire et de l'œdème [14].

Toxicité

La plante contient des parties irritantes, urticantes ou piquantes.

Effets indésirables

Aucun connu.

Bibliographie

- Cheng J, Kondo K, Suzuki Y, et al. (2003) Life Sci 72: 2263-71
- Chung F, Chang J, Wu FF (1990) Anti-allergic effect of total flavone of *Hippophae* (TFH). Chinese Pharmacognosy 21(12): 6
- Fan J, Ding X, Gu W (2006) Radical-scavenging proanthocyanidins from sea buckthorn seed. Food Chem 102(1): 168-77
- Ganju, Padwad Y, Singh R, et al. (2005) Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. Int Immunopharmacol 5: 1675-84
- Gao ZL, Gu XH (2003) Effect of sea buckthorn on liver fibrosis: a clinical study World J Gastroenterol 9(7): 1615-7
- Ge XY, Shi GF, Ma CY (1986) Chin Tradit. Herb Drugs 17: 42-4
- Geetha S, Sai Ram M, Singh V, et al. (2002) Anti-oxidant and immunomodulatory properties of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) an in vitro study. J Ethnopharmacol 79: 373-8
- Geetha S, Sai Rama M, Mongiaa SS, et al. (2003) Evaluation of antioxidant activity of leaf extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) on chromium (VI) induced oxidative stress in albino rats. J Ethnopharmacol 87: 247-51
- Jin Y, Yiao W (2003) Brief review on Shaji research. Zhongyiyao Xinxu 20: 21-2
- Johansson AK, Korte H, et al. (2000) Sea buckthorn berry oil inhibits platelet aggregation. J Nutr Biochem 11(10): 491-5
- Li TSC, Beveridge THJ, Drover JCG (2007) Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. Food Chem 101(4): 1633-9
- Negi PS, Chauhan AS, Sadia GA, et al. (2005) Antioxidant and antibacterial activities of various seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed extracts. Food Chem 92: 119-24
- Shukla SK, Chaudhary P (2006) Protection from radiation-induced mitochondrial and genomic DNA damage by an extract of *Hippophae rhamnoides*. Environ Mol Mutagen 47(9): 647-56
- Sibileva LA, Sabynich LV (1994) Anti-inflammatory effect of thick extractions of the schrot of fruit of *Hippophae rhamnoides* L. Rastitelnye Resursy 30(3): 70-4
- Suomela JP, Ahotupa M (2006) Absorption of flavonols derived from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) and their effect on emerging risk factors for cardiovascular disease in humans. J Agric Food Chem 54(19): 7364-9
- Sun B, Zhang P, Zhai WQ, et al. (2003) In China sea buckthorn, grown widely in the northern and southwestem regions, is a phytoprotective agent to human health. J Chin Med Mater 26: 875-7
- Teng BS, Lu YH, Wang ZT, et al. (2006) *In vitro* anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. Pharmacol Res 54: 186-94
- Wang ZY, Luo XL, He CP (2006) Management of burn wounds with *Hippophae rhamnoides* oil. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 26(1): 124-5
- Wang ZR, Wang L, Yin HH, et al. (2000) Effect of total flavonoids of *Hippophae rhamnoides* on contractile mechanics and calcium transfer in stretched myocyte. Space Med Med Eng 13: 6-9
- Yang F, Quan J, Zhang TY, Ito Y (1998) Multidimensional counter-current chromatographic system and its application. J Chromatogr A 803: 298-301
- Yang XY, Qu WJ (2006) Effect of flavonoids from *Hippophae rhamnoides* residues on blood lipid metabolism and antioxidative activity in dimaeteric rats. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 31(13): 1109-12
- Zhang P, Mao YC (2005) Changes in apoptosis-related genes expression profile in human breast carcinoma cell line Bcap-37 induced by flavonoids from seed residues of *Hippophae Rhamnoides* L. Ai Zheng 24(4): 454-60
- Zhang X, Zhang M (2001) Effect of total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. on sympathetic activity in hypertension. Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao 32(4): 547-50

Article de synthèse

Ethnopharmacologie

Aperçu ethnobotanique et phytopharmacologique sur *Nasturtium officinale* R. Br

H. Rammal¹, C. Younos¹, J. Bouayed¹, F. Desor¹, A. Chakou², N. Necerbey², R. Soulimani¹

¹Ethnobotanique et pharmacologie/Anxiété, stress oxydant et bioactivité, université Paul-Verlaine de Metz, BP 4102, F-57040 Metz Cedex 01, France

²CRD, Groupe Sidal, BP 09F, Mohammadia, Alger, Algérie

Correspondance : e-mail : soulimani@univ-metz.fr

Ethnobotanique

Nasturtium officinale L., plante de la famille des Brassicaceae, est connu sous les noms de cresson de fontaine, cresson, cresson d'eau, cresson de ruisseau, cardamine, grasson, berle. D'ailleurs, en persan, elle s'appelle *alaf-e tchema*, qui veut dire « herbe des sources ». C'est une plante des régions tempérées du monde.

Le nom du genre *Nasturtium* provient des termes latins *nasum*, nez, et *torquere*, tordre, grimacer, par allusion à la saveur piquante du cresson.

Le cresson de fontaine est une plante herbacée vivace qui forme des pousses rampantes au fond de l'eau, puis des tiges creuses qui se dressent hors de l'eau à l'extrémité des rameaux. Elle pousse communément dans les zones humides, notamment aux voisinages des cours d'eau, de 0 à 2 000 mètres d'altitude. Les tiges sont étalées, voire couchées sur le sol ou sur les plans d'eau. Elles peuvent dépasser 2 mètres de long. Elles émettent facilement des racines adventives au niveau des nœuds. Les feuilles émergentes sont pennées et charnues, alternes, vert foncé, munies d'un long pétiole. Elles sont composées de cinq folioles ovales plus ou moins arrondies, la foliole terminale étant plus grande que les autres.

À l'aisselle des feuilles peuvent apparaître des bulbilles, qui se détachent et donnent naissance à de nouvelles plantes.

Les petites fleurs blanches (5-6 mm) à anthères jaunes apparaissent en grappes terminales tout l'été, de juin à septembre. Le fruit est une silique de 1 à 2 centimètres de long, linéaire ou linéaire oblongue, terminée par un style épais, à valves sans nervures. La silique renferme de petites graines brun rouge, ovales, sur deux rangs dans chaque loge de la silique.

C'est une plante remarquable par ses capacités de reproduction végétative. Elle peut vivre en milieu aquatique sans aucune attache avec le sol. Normalement, on la

cueille quand elle est à l'état sauvage, mais aujourd'hui, cette plante est cultivée dans les cressonnières.

L'aire d'origine de cette espèce couvre une très vaste zone de l'Ancien Monde, incluant l'Europe, l'Asie jusqu'à la Chine et l'Afrique du Nord.

Parties utilisées : feuilles et graines.

Utilisations traditionnelles

Selon Chevalier [3], les Grecs utilisaient cette plante pour le traitement des troubles psychiques. Dans la médecine traditionnelle islamique, elle était préconisée pour les enfants comme fortifiant. Elle était aussi utilisée pour nettoyer et fluidifier le sang et aussi comme tonique printanière.

Considéré de tout temps comme diurétique, stimulant et anti-scorbutique, le cresson de fontaine était, en outre, réputé chez les Romains qui en mangeaient de grandes quantités, notamment parce qu'ils croyaient que cette plante pouvait prévenir la calvitie et qu'elle stimulait l'activité de l'esprit. Quant aux Grecs, ils affirmaient que le cresson pouvait « redonner raison aux esprits dérangés » et atténuer les effets de l'ivresse, d'où son emploi général dans les banquets.

Les feuilles fraîches du cresson sont utilisées comme salade verte et comme garniture. Les feuilles peuvent être cuites à la vapeur et mangées comme légume. Le cresson est nutritif, étant riche en minéraux, protéines, et vitamines. Le jus fraîchement pressé a été employé intérieurement et extérieurement dans le traitement des plaintes de la cage thoracique et des reins, des irritations chroniques et des inflammations de la peau [12]. C'est un dissolvant de nicotine et est employé sur les tabacs forts [4].

Appliqué extérieurement, il a une réputation de longue date comme tonique efficace de cheveux, aidant à favoriser

la croissance des cheveux épais [16]. Un cataplasme des feuilles serait un traitement efficace pour guérir les tumeurs glandulaires ou le gonflement lymphatique [16].

Phytochimie

Les graines contiennent le 2-phénythyl glucosinolate (gluconasturtiine) [18]. 100 g de feuilles fraîches de cresson contiennent 43 mg de vitamine C, 4700 UI de vitamine A [5], et 34 mg de α -tocophérol [9], niacine, acide ascorbique, thiamine, riboflavine et fer. Deux aglycons sont présents dans *N. officinale* avec plus de quercétine que de kaempférol (polyphénol) [7, 11].

Pharmacologie

Nasturtium officinale a des propriétés médicinales importantes : dépurative et diurétique [15]. Les feuilles du cresson sont toniques, apéritives, stomachiques, expectorantes et anti-scorbutiques, fluidifiantes, purgatives, stimulantes, hypoglycémiantes, odontalgiques [2, 4, 12]. Il a été également employé comme remède contre l'anémie, l'eczéma, les désordres des reins et du foie, la tuberculose, les ébullitions, les verrues et les tumeurs [2, 4, 6, 12, 14]. Il possède une activité antioxydante [10]. Des effets anticancéreux et antimittotiques de cette plante ont été rapportés [17, 19]. *N. officinale* agit comme inducteur de la phase I et de la phase II des enzymes de détoxification dans les cellules HepG2 et peut inhiber la génotoxicité de certains composés spécifiques [13]. *Nasturtium officinale* réduit le stress oxydatif et améliore la capacité antioxydante chez les rats hypercholestérolémiques [20]. Il provoque aussi la diminution du cholestérol total, des triglycérides, LDL et HDL [1].

Gill et al. [8] ont récemment signalé que le cresson réduit les dommages de l'ADN des lymphocytes du sang et modifie le statut antioxydant chez l'adulte sain.

Toxicité

La consommation excessive de cresson cru peut provoquer des troubles urinaires (cystite). Il arrive que la plante soit contaminée par les larves de la douve du foie (*Fasciola hepatica*), ver parasite habituel des ruminants, qui peut se montrer dangereux pour l'homme en s'enkystant dans le foie.

Bibliographie

- Bahramikia S, Yazdanparast R (2008) Effect of hydroalcoholic extracts of *Nasturtium officinale* leaves on lipid profile in high-fat diet rats. *J Ethnopharmacol* 115(1): 116-21
- Bown D (1995) *Encyclopaedia of Herbs and their Uses*. Dorling Kindersley, Londres
- Chevalier A (1996) *The encyclopedia of medicinal plants* GRB ED. Milan, Italie
- Chiej R (1984) *Encyclopaedia of Medicinal Plants*. MacDonald. Covers plants growing in Europe. Also gives other interesting information on the plants. Good photographs
- (DHHS) United States Department of Health and Human Services (1987) *Diet, Nutrition and Cancer Prevention: A Guide to Food Choices*; National Institutes of Health (US), Bethesda, Rev
- Foster S, Duke JA (1990) *A Field Guide to Medicinal Plants*. Eastern and Central N. America. Houghton Mifflin Co
- Franke AA, Custer LJ, Arakaki C, Murphy SP (2004) Vitamin C and flavonoid levels of fruit and vegetables consumed in Hawaii. *J Food Compos Anal* 17: 1-35
- Gill CI, Halder S, Boyd LA, et al. (2007) Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 85: 504-10
- Hadas SP, Meir S, Akiri B, Kanner J (1994) Oxidative defense systems in leaves of three edible herb species in relation to their senescence rates. *J Agric Food Chem* 42: 2376-81
- Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM (2005) Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *J Agric Food Chem* 53: 2928-35
- Justesen U, Knuthsen P (2001) Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chem* 73: 245-50
- Launert E (1981) *Edible and Medicinal Plants*. Hamlyn, Covers plants in Europe. A drawing of each plant, quite a bit of interesting information
- Lhoste EF, Gloux K, De Waziers I, et al. (2004) The activities of several detoxication enzymes are differentially induced by juices of garden cress, water cress and mustard in human HepG2 cells. *Am J Clin Nutr* 150: 211-19
- Lust J (1983) *The Herb Book*. Bantam books, Lots of information tightly crammed into a fairly small book
- Oliveira F, Akisue G, Akisue MK (1991) *Farmacognosia*, São Paulo, Atheneu
- Phillips R, Foy N (1990) *Herbs* Pan Books Ltd. Londres
- Potter JD, Steinmetz K (1996) Vegetables, fruit and phytoestrogens as preventive agents. *IARC Sci Publ* 139: 61-90
- Tookey HL, VanEtten CH, Daxenbichler ME (1980) Glucosinolates. In: I. E. Liener (ed), *Toxic Constituents of Plant Stuffs*. New York: Academic Press
- Verhoeven DT, Versace H, Goldbohm RA, et al. (1997) A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 103: 79-129
- Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A (2008) *Nasturtium officinale* reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chemico-Biological Interactions* 172(3): 176-84

Article original

Phytonutrition expérimentale

Caractérisation et bioévaluation des polyphénols : nouveaux domaines d'application en santé et nutrition

J. Bouayed¹, H. Rammal¹, C. Younos¹, A. Dicko³, R. Soulimani^{1,2}

¹ Ethnobotanique et pharmacologie/anxiété, stress oxydant et bioactivité, université Paul-Verlaine de Metz, BP 4102, 57040 Metz cedex 01, France

² Agress, Association des groupes de recherche et d'études sur stress et santé, BP 4102, 57040, Metz cedex 01, France

³ LCME, université Paul-Verlaine de Metz, Technopôle, 57070 Metz, France

Correspondance : e-mail : soulimani@univ-metz.fr ; agress@wanadoo.fr

Résumé : Dans cette étude, nous avons montré que plusieurs variétés de prunes permettent la protection des granulocytes contre le stress oxydant par leur potentiel inhibiteur d'accumulation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui sont très cytotoxiques et impliquées dans de nombreux troubles. Ainsi, la consommation de 100 g de prunes fraîches correspondrait en effet antioxydant à l'équivalent de 614 et 2 138 mg de vitamine C. Le profil chimique des polyphénols majoritaires des prunes a été établi par nos études grâce à des méthodes analytiques de chromatographie (CLHP) montrant que l'acide néochlorogénique est le polyphénol prédominant. Les prunes se sont également révélées une source de polyphénols ayant un double effet : antioxydant et anxiolytique, tels que l'acide chlorogénique, ce qui donne aux polyphénols de nouveaux champs d'applications dans le domaine de la prévention.

Mots clés : Prunes – Polyphénols – Antioxydant – Anxiolytique – Acide chlorogénique – Santé

Characterization and bio-evaluation of polyphenols from some plum varieties and new fields for their use in health and diet

Abstract: In the present study, we have shown that plums protected granulocyte cells from oxidative stress by their potential to inhibit the intracellular reactive oxygen species accumulation. The consumption of 100 g of fresh plums can provide antioxidants equivalent to 613.98–2137.59 mg of vitamin C. The major polyphenols in plums were identified and quantified using reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), which revealed that neochlorogenic acid was the predominant polyphenol. Plums are a source of polyphenols with dual effects: antioxidant and anxiolytic, like chlorogenic acid, which may provide health-promoting advantages to the consumer.

Keywords: Plums – Polyphenols – Antioxidant – Anxiolytic – Chlorogenic acid – Health

Introduction

Les polyphénols constituent une grande classe chimique. Ces métabolites secondaires des végétaux disposent d'une extrême variété de structures et d'activités biologiques [1]. Actuellement, les études portant sur les polyphénols connaissent un grand essor. Une grande partie d'entre elles a été réalisée afin d'informer et de sensibiliser les consommateurs et les pouvoirs publics sur l'intérêt des fruits et légumes riches en polyphénols, antioxydants naturels aux forts potentiels antioxydants et cytoprotecteurs [1]. À titre d'exemple, plusieurs enquêtes épidémiologiques ont montré les effets bénéfiques de la consommation des fruits et des légumes ayant une forte concentration en composés phénoliques dans la prévention des maladies liées au stress oxydant telles que les maladies cardiovasculaires, les maladies cérébrovasculaires, les maladies métaboliques et le cancer [5, 6, 7, 12]. Un des effets protecteurs des antioxydants alimentaires contre les maladies liées au stress oxydant est dû à leur contribution dans le maintien de l'homéostasie redox des cellules [13].

De nombreuses espèces de prunes peuvent fournir des avantages sanitaires pour les consommateurs, puisque ces fruits constituent une véritable source d'antioxydants naturels [1, 8, 9]. Des tests acellulaires ont montré que les prunes possèdent une activité antiradicalaire et cytoprotectrice importante [1, 8, 9]. En effet, ces expériences ont permis d'apprécier, *in vitro*, le pouvoir piègeur des prunes ou de leurs composés phénoliques contre des radicaux libres de synthèse. Dans cette étude, le pouvoir protecteur des prunes contre l'accumulation intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) a été évalué dans

des cellules vivantes de souris, les granulocytes, soumises aux conditions de stress oxydant. Les principaux composés phénoliques des variétés de prunes étudiées ont été identifiés par la chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Matériel et méthodes

Animaux

Ce sont des souris du centre d'élevage Charles-River, France, qui ont été utilisées. Toutes les expériences réalisées sur les animaux sont en conformité avec les directives du Conseil de la Communauté européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC).

Prunes

Au cours de ce travail, sept variétés de prunes (*Prunus domestica* L.), dont la mirabelle, ont été cueillies au stade de la maturité commerciale dans la région Lorraine (nord-est de la France) durant le mois de septembre 2006. Les variétés étudiées sont les suivantes : bleue noire bastien, prince, reine-claude Bavay, reine-claude dorée (RC1380), mirabelle (M1510), président, quetsche (Q2910). Le jour de la cueillette, les fruits ont été coupés en deux et les noyaux retirés. Les prunes dénoyautées ont été congelées et ensuite lyophilisées (lyophilisateur : ALPHA 1-2 LD, Fisher Bioblock) et stockées à -20°C .

Extraction

La méthode d'extraction utilisée a été décrite par Kim et al. [8, 9] : il s'agit d'une extraction hydrométhanolique à partir de 10 g de prunes lyophilisées et broyées en poudre.

Test cellulaire

Les granulocytes du sang ont été obtenus à partir des souris anesthésiées puis sacrifiées comme nous l'avons décrit précédemment [2, 3]. Le taux des ERO a été évalué en utilisant la sonde 2',7'-diacétate dichlorofluoresceine (DCFH-DA), traceur de ces métabolites réactifs [3]. Le pouvoir protecteur des extraits de prunes ou des polyphénols a été évalué comme nous l'avons décrit précédemment [3] en comparant le statut redox intra-

cellulaire des granulocytes issus du sang selon trois états oxydatifs différents : état oxydatif normal (ou état sans stress oxydatif), état avec stress oxydatif et état avec stress oxydatif mais préalablement prétraité avec un extrait de prune. Le stress oxydant a été induit par l'ajout du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans le milieu extracellulaire. L'activité antioxydante des extraits de prunes a été exprimée en équivalence à la vitamine C (VCE) par 100 g de prunes fraîches.

CLHP

L'appareil utilisé est un Waters 600 Pump équipé d'une boucle d'injection de 20 μl . Les analyses ont été réalisées sur une colonne Alltech Intertsil ODS-5 ; 4,6 x 150 mm, la taille des particules est de 5 μm . Le détecteur est un Waters 486 Tunable. Les mesures ont été réalisées à la longueur d'onde 320 nm. Les conditions ultérieurement décrites par Kim et al. [8] ont été utilisées pour l'analyse CLHP des composés polyphénoliques des prunes.

Résultats

Le test cellulaire montre que les prunes possèdent un effet préventif cytoprotecteur contre le stress oxydant induit par le prooxydant H_2O_2 (Tableau 1). Le pouvoir antioxydant des différentes variétés de prunes a été évalué en équivalence à la vitamine C, antioxydant de référence. L'activité antioxydante totale des sept variétés de prunes varie entre 614 et 2 138 mg VCE (équivalent Vit C) par 100 g de matière fraîche.

Les principaux composés phénoliques des prunes ont été identifiés par CLHP par rapport aux temps de rétention de leurs standards commerciaux hormis l'acide néochlorogénique, dont le standard commercial n'est pas disponible, identifié selon les méthodes déjà décrites par Kim et al. [8] et Donovan et al. [4]. L'acide néochlorogénique a été quantifié en équivalence à son isomère, l'acide chlorogénique, qui a la même sensibilité à 320 nm. L'acide néochlorogénique est le polyphénol qui prédomine dans les sept variétés de prunes (Tableau 2).

Discussion

Le pouvoir cytoprotecteur des espèces de prunes étudiées contre le stress oxydant a été mis en évidence pour la

Tableau 1. L'effet piègeur des extraits de prunes sur les ERO

Variétés	Bleue noire Bastien	Prince	Reine-claude Bavay	Reine-claude dorée	Mirabelle	Président	Quetsche
Pouvoir piègeur des ERO (mg VCE/100 g)	2137,59 $\pm 10,96$	1233,70 $\pm 47,15$	914,43 $\pm 56,99$	773,43 $\pm 21,89$	706,28 $\pm 23,36$	613,98 $\pm 30,99$	515,64 $\pm 30,91$

L'activité antioxydante totale est exprimée en équivalence à la vitamine C, VCE. Tous les résultats sont rapportés en moyenne \pm ESM ($n = 3$) par 100 g de matière fraîche.

Tableau 2. Concentration des polyphénols majoritaires des prunes testées en mg/100g de matière fraîche

Polyphénols	Variétés						
	Bleue noire Bastien	Prince	Reine-claude Bavay	Reine-claude dorée	Mirabelle	Président	Quetsche
Acide néochlorogénique	426,15 ± 0,14	147,88 ± 3,39	163,81 ± 1,08	204,29 ± 1,03	105,31 ± 0,94	127,54 ± 0,72	79,27 ± 1,56
Acide chlorogénique	41,03 ± 0,25	5,08 ± 0,41	22,86 ± 1,42	21,46 ± 0,03	18,63 ± 0,63	11,77 ± 1,07	8,16 ± 0,09
Acide caféique	14,38 ± 0,88	1,24 ± 0,06	0,63 ± 0,02	0,59 ± 0,01	1,96 ± 0,01	2,74 ± 0,04	0,72 ± 0,02
Acide protocatéchuique	95,29 ± 6,92	43,02 ± 2,21	33,94 ± 1,25	20,09 ± 0,88	33,67 ± 0,00	16,91 ± 1,13	18,80 ± 1,37
Acide p-coumarique	0,85 ± 0,05	0,50 ± 0,00	0,36 ± 0,06	0,73 ± 0,00	1,07 ± 0,04	0,56 ± 0,00	ND

Les données sont exprimées en moyenne ± ESM (n = 3). ND : non détecté.

première fois au cours de cette étude de manière parallèle sur un modèle cellulaire *in vitro* et sur l'organisme *in vivo*. Nous avons trouvé que les extraits de prunes inhibent l'accumulation intracellulaire des espèces cytotoxiques de l'oxygène au niveau de cellules prélevées directement au niveau d'individus. Le pouvoir antioxydant et cytoprotecteur des prunes a été comparé à celui de la vitamine C, antioxydant de référence. Nous en avons ainsi déduit que la consommation de 100 g de prunes fraîches fournit aux consommateurs en antioxydants l'équivalent de 614 à 2 138 mg de vitamine C, en fonction de la variété de prune testée.

Le profil polyphénolique des prunes a été établi par plusieurs équipes montrant que les acides hydroxycinnamiques sont les polyphénols majoritaires des prunes avec une prédominance nette pour l'acide néochlorogénique [4, 8, 9]. Il a été rapporté que les acides hydroxycinnamiques des prunes représentent environ 90 % du matériel phénolique alors que les flavonoles ne représentent que de 2 à 3 % des phénols totaux [4]. Nos résultats sont en concordance avec ceux qui ont été obtenus par d'autres équipes montrant que le polyphénol majoritaire des prunes est l'acide néochlorogénique. Le test cellulaire a révélé que l'acide protocatéchuique, l'acide néochlorogénique et l'acide chlorogénique sont les principales sources antioxydantes des prunes permettant la prévention du stress oxydant (résultat non présenté) et les effets cytoprotecteurs puissants connus des polyphénols. Une étude de corrélation nous a aussi révélé que les différents polyphénols des prunes n'agiraient pas en synergie mais plutôt par effet additif (résultat non présenté). Ces différents résultats mettent l'accent sur le pouvoir cytoprotecteur préventif des prunes contre le stress oxydant et mettent en évidence l'intérêt que présentent certaines sources végétales telles que les prunes dans la prévention des maladies liées au stress oxydant et ses effets cytotoxiques, en particulier les pathologies lourdes et chroniques telles les maladies dégénératives et neurodégénératives.

Dans une autre étude, nous avons tenté de vérifier si le pouvoir antioxydant de l'acide chlorogénique était dû à

son pouvoir neuroactif ou à son pouvoir cytoprotecteur. Nous avons ainsi démontré pour la première fois les effets couplés antioxydants mais aussi anxiolytiques de l'acide chlorogénique. Ces effets anxiolytiques ne semblent pas être liés aux effets antioxydants mais à des effets neuroactifs propres puisque l'acide chlorogénique agirait vraisemblablement par interaction avec les récepteurs GABA_A, récepteurs impliqués dans la régulation du niveau de l'anxiété [2], puisque les effets anxiolytiques ont été antagonisés par le flumazénil, une molécule antagoniste de référence des récepteurs GABA. La dose active de l'acide chlorogénique sur l'anxiété des souris a été très élevée (20 mg/kg) par rapport à l'anxiolytique de référence, le diazépam (1 mg/kg) [2]. Un résultat similaire a été observé pour un autre polyphénol à profil anxiolytique issu du thé vert [14]. Il a été aussi révélé que d'autres polyphénols minoritaires des prunes tels que la quercétine et les catéchines possèdent des propriétés anxiolytiques [10, 11]. La consommation de 100 g de prunes fraîches fournit aux consommateurs en acide chlorogénique entre 5,08 et 41,03 mg (Tableau 2). Les propriétés pharmacologiques de l'acide chlorogénique sont très intéressantes et ouvrent d'autres domaines d'application et de prévention dans la santé publique. Ainsi les résultats obtenus avec ce polyphénol ouvrent de nouvelles voies d'investigation puisque en plus de leurs effets classiques antioxydants cytoprotecteurs puissants contre le stress oxydant [2] et leur présence très abondante dans les fruits tels que les prunes, les pommes et les cerises [2, 8, 9], ce type de polyphénols peut présenter d'autres propriétés telles que des effets neurotropes et en particulier anxiolytiques intéressants en cas d'anxiété élevée souvent associée à un stress oxydant corrélé [2].

En conclusion, les prunes constituent une source alimentaire riche en polyphénols. Ces antioxydants naturels aux effets cytoprotecteurs peuvent jouer un important rôle nutritionnel de prévention contre de nombreuses maladies liées à l'anxiété et au stress oxydant telles que le diabète, l'hypertension, le cancer et d'autres maladies chroniques. Cette approche de prévention peut aussi

s'étendre contre d'autres troubles psycho-neurologiques en raison de la présence de molécules neuroactives telles que l'acide chlorogénique.

Bibliographie

1. Bouayed J (2007) Étude de la corrélation anxiété/statut oxydatif des granulocytes chez la souris et évaluation des effets antioxydants/ neuroactifs des polyphénols extraits de *Prunus domestica* L. Thèse, Université de Metz
2. Bouayed J, Rammal H, Dicko A, et al. (2007) Chlorogenic acid, a polyphenol from *Prunus domestica* (Mirabelle), with coupled anxiolytic and antioxidant effects. *J Neurol Sci* 262: 77-84
3. Bouayed J, Rammal H, Younos C, Soulimani R (2007) Positive correlation between peripheral blood granulocyte oxidative status and level of anxiety in mice. *Eur J Pharmacol* 564: 146-9
4. Donovan JL, Meyer AS, Waterhouse AI (1998) Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus domestica*). *J Agric Food Chem* 46: 1247-52
5. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, et al. (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *Lancet* 342: 1007-11
6. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, et al. (1997) Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men. The caerphilly study. *Am J Clin Nutr* 65: 1489-94
7. Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehily AM, et al. (1997) Potentially anticarcinogenic secondary metabolites from fruit and vegetables. Clarendon Press, Oxford, pp. 313-29
8. Kim DO, Chun OK, Kim YJ, et al. (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *J Agric Food Chem* 51: 6509-15
9. Kim DO, Jeong SW, Lee CY (2003) Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. *Food Chem* 81: 321-6
10. Marder M, Paladini AC (2002) GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Topics Med Chem* 2: 853-67
11. Medina JH, Viola H, Wolfman C (1997) Overview-Flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands. *Neurochem Res* 22: 419-25
12. Muldoon MF, Kritchevsky SB (1996) Flavonoids and heart disease. *Brit Med J* 312: 458-9
13. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39: 44-84
14. Vignes M, Maurice T, Lanté F (2006) Anxiolytic properties of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain Res* 1110: 102-15

Résumé

Au cours de cette étude, l'expression des gènes codants de quatre sous types des récepteurs centraux (GABA_A, 5-HT_{1A}, μ -opioïdes et α_1 -adrénergiques) impliqués dans la modulation de l'anxiété a été évaluée chez les souris anxieuses et non anxieuses. L'impact de l'anxiété trait sur les réponses immunitaires cellulaire et humorale et sur le niveau du statut oxydatif au niveau du SNC (neurones et cellules gliales) et au niveau périphérique (lymphocytes, granulocytes et monocytes) a été mis en évidence. En même temps, l'effet de l'anxiété trait couplée au modèle de stress expérimental anxiogène par contention, sur les réponses immunitaires cellulaire et humorale a été évalué. En effet, le niveau d'anxiété élevé induit d'une part, un effet dépressif significatif sur l'immunité cellulaire (lymphocytes totaux, TCD4⁺ et TCD8⁺) et humorale (IgA et IgE) et d'autre part, une augmentation significative du niveau intracellulaire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) des neurones et des cellules gliales au niveau du cortex cérébral, du cervelet et de l'hippocampe et des granulocytes, des lymphocytes et des monocytes au niveau périphérique. De la même manière, l'anxiété trait couplée au stress aigu et subaigu par contention a provoqué une dépression de certains paramètres de l'immunité cellulaire (lymphocytes totaux, TCD4⁺, TCD8⁺ et NK) et humorale (IgA, E et G) et une stimulation des autres paramètres (granulocytes et monocytes). Ces travaux ont permis ainsi de valider scientifiquement le caractère anxiogène du modèle du stress par contention, d'établir de manière valide et reproductible le lien entre le niveau d'anxiété élevé chez les animaux et leur statut oxydatif inducteur d'une cytotoxicité ainsi que le rôle de l'expression des gènes codants de 4 sous types des récepteurs dans l'expression de cette anxiété élevée et d'un statut oxydatif important au niveau des cellules périphériques du système immunitaire et des neurones et cellules gliales au niveau central.

Mots clés : Anxiété; Immunité cellulaire et humorale; Stress par contention; Statut oxydatif; Neurones et Cellules gliales; Lymphocytes, Granulocytes; Monocytes; Médicaments homéopathiques, Cytotoxicité.

Abstract

In this study, genes expression from four central receptors (GABA_A, 5-HT_{1A}, μ -opioids and α_1 -adrenergic) involved in the modulation of anxiety was assessed in anxious and non anxious mice. The impact of anxiety on the cellular and humoral immunity and on the oxidative status at the SNC (neurons and glial cells) and peripheral (lymphocytes, granulocytes and monocytes) level was highlighted. At the same time, the effect of anxiety coupled with an anxiogenic restraint stress, on the cellular and humoral immunity was also evaluated. Indeed, the high level of anxiety induced firstly, a significant depressive effect on cellular (total lymphocytes, TCD4⁺ and TCD8⁺) and humoral (IgA and IgE) immunity, and secondly, a significant increase of the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) of neurons and glial cells in the cerebral cortex, the cerebellum and the hippocampus and in the peripheral blood granulocytes, monocytes and lymphocytes. In the same way, the anxiety coupled to acute and subacute restraint stress provoked, a depression of some parameters of cellular (total lymphocytes, TCD4⁺, TCD8⁺ and NK) and humoral (IgA, E and G) immunity, and a stimulation of others (granulocytes and monocytes). These works thus made it possible to validate scientifically the anxiogenic character of the model of restraint stress, to establish in a valid and reproducible way the bond between the high level of anxiety in animals and their oxidative status inductive of a cytotoxicity as well as the role of the expression of coding genes of 4 receptors in the expression of this high anxiety and of a significant oxidative status at the level of the peripheral cells of the immune system and the neurons and glial cells at the central level.

Key words: Anxiety; Cellular and Humoral immunity; Restraint stress; Oxidative status; Neurons and Glial cells; Lymphocytes, Granulocytes; Monocytes; Homeopathic drugs; Cytotoxicity.