



HAL
open science

Régulations des systèmes nerveux central et immunitaire en condition de stress : rôle de la corticotropin-releasing hormone et de ses récepteurs

Guillaume Harlé

► To cite this version:

Guillaume Harlé. Régulations des systèmes nerveux central et immunitaire en condition de stress : rôle de la corticotropin-releasing hormone et de ses récepteurs. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT : 2016LORR0126 . tel-01754691

HAL Id: tel-01754691

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01754691>

Submitted on 10 Jan 2019

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
DE LORRAINE



STRESS IMMUNITÉ
PATHOGÈNES

Ecole doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Guillaume HARLE

Régulations des systèmes nerveux central et immunitaire en condition de stress : rôle de la corticotropin-releasing hormone et de ses récepteurs.

Soutenue le 21.09.2016

Membres du jury :

Rapporteurs : Mr. David DUBAYLE

**Maitre de conférences, Université Paris Descartes,
Paris**

Mme Sophie HILLION

**Maitre de conférences et praticien hospitalier, Université
de Bretagne Occidentale, Brest**

Examineurs : Mme Catherine STRAZIELLE

**Professeur des universités et praticien hospitalier,
Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse)**

Mme Armelle ROPARS

**Maitre de conférences, Université de Lorraine, Nancy
(co-directeur de thèse)**

Mr. Simon THORNTON

Professeur des universités, Université de Lorraine, Nancy

Mme Natacha BESSIS

Professeur des universités, Université Paris 13, Paris

**Membre invité : Mme Stéphanie
GRANDEMANGE**

Maitre de conférences, Université de Lorraine, Nancy

« Ce n'est qu'en essayant continuellement que l'on finit par réussir. Autrement dit : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche. »

(Devise Shadok)

Remerciements

Alors ça y est, nous y voilà ... Les remerciements.

Il est évident que tout ce travail de thèse ne serait pas ce qu'il est sans une aide précieuse de plusieurs personnes, collègues et ami(e)s. Il est donc temps pour moi de lever le voile et de remercier l'ensemble de ces personnes sans qui ce projet n'aurait pas abouti.

Je vous préviens, cela risque d'être long. Pour les plus courageux qui liront ces remerciements jusqu'au bout, prenez une chaise et un bon verre pour aider à passer le temps.

Dans un premier temps, je tiens sincèrement à remercier l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce projet. Merci à vous Mme HILLION Sophie, Mme BESSIS Natacha et Mr. THORNTON Simon.

- Evidemment, j'ai reçu une aide importante de l'équipe sympa (ou SIMPA) :

Je tiens à remercier Catherine, sans qui je n'aurais pas eu la possibilité de faire cette thèse. Vous m'avez ouvert les portes des neurosciences et des études comportementales, monde qui m'était totalement inconnu et que j'ai appris à apprécier. Je suis conscient que vous m'avez apporté des compétences qui pourront m'être fortement utiles pour la suite de mon projet professionnel et je vous en suis reconnaissant.

Je tiens aussi à remercier Armelle, qui me supporte depuis maintenant 5 ans (depuis mon stage de M2) et avec qui je partage le même bureau depuis mon arrivée au labo. Grâce à vous, je me suis familiarisé avec de nombreuses techniques qui me permettent aujourd'hui d'être autonome et de me projeter dans un projet en immuno. Je n'oublierai pas nos échanges, nos conversations studieuses et scientifiques (mais aussi moins studieuses et moins scientifiques). Je savais que si j'avais besoin de quelque chose, je pouvais venir vous voir. Soit vous aviez de quoi m'aider, soit vous usiez de tous vos contacts pour me trouver ce dont j'avais besoin. Je vous remercie sincèrement pour ces 5 années à vos côtés.

Quant à Jean-Pol, le patron, le chef (ou Mr FRIPPIAT), je vous remercie de m'avoir accepté au sein de votre équipe. Bien que vous n'étiez pas directement

concerné par l'encadrement de ma thèse, vous vous êtes impliqué dans ce projet. Je vous remercie pour votre soutien.

Merci à toi Sandranouchka pour ton aide sans limite ni conditions. Sans toi, je ne serai pas aujourd'hui un expert au FACS (bon d'accord je ne suis pas un expert, mais je sais au moins m'en servir). Je me souviens encore de nos RDV à 23h-minuit au labo pour certaines de mes cinétiques. Rien ne t'obligeait à passer une partie de la nuit au labo et pourtant tu l'as fait comme si c'était une évidence. Merci aussi pour cette complicité et ces moments de rire. Grâce à toi, je ne regarderai plus jamais une écharpe ni une clé USB de la même façon et ça n'a pas de prix. Je te remercie vraiment pour tout ce que tu as fait pour moi.

Je tiens aussi à remercier le duo Nassima/Stéphanie (alias Nassimouchka et Pierre Richard) qui pour moi est indissociable. Vous m'avez été d'une grande aide et d'un grand soutien sans faille pendant toutes ces années. Mais au delà de ça, vous êtes une bouffée d'air frais dans le labo. Toujours souriantes et agréables, c'est un vrai bonheur de travailler avec vous. Nassimouchka, tu sais accueillir les nouveaux arrivants (pauvre petit stagiaire que j'étais). Nous sommes arrivés en même temps au labo, à 1 mois d'intervall, et tu m'as accueilli avec un coup de coude dans la tête et bien d'autres misères. Bonjour l'accueil ... Mais j'ai tout de suite su que ça accrochera entre nous. Quant à Pierre Richard, comme ton surnom l'indique, ta maladresse te précède. Je n'avais jamais vu avant toi une personne tomber au ralenti sur un chariot à roulette, tout en sauvant les tubes que tu avais dans les mains. Pour moi cette chute restera exceptionnelle, tout comme le fait d'avoir pu travailler avec toi.

Je remercie aussi Coralie et Jérémy (alias coco et pépère). Deux thésards magnifiques, aussi bosseurs que râleurs (dans le bon sens du terme). Coco, tu es la première stagiaire que j'ai co-encadrée au début de ma thèse pour ton stage de M1. Ça a été un vrai plaisir de travailler avec toi, malgré quelques petites anecdotes qui me font encore rire aujourd'hui mais que je ne dévoilerai pas ici (vive la qPCR). Pépère, pour toi on ne compte plus les dossiers qu'on a accumulés alors que tu es le dernier arrivé pour ton M2. Entre ta réplique préférée « je suis un tout petit », Batman, le T-rex, ton « régime » alimentaire et j'en oublie, tu es le clown du labo mais à côté de ça, tu es un vrai bosseur. Vous voir tous les deux aujourd'hui en thèse, prouve vos compétences et votre implication. Je vous souhaite vraiment d'aller loin, un bon post-doc ou ce que vous voulez pour la suite.

Pour finir avec le labo, je tiens vraiment à remercier Lisiane et Anne-Marie. Je ne sais pas si on a réussi à se croiser dans un couloir sans se dire une petite « boutade » pour rigoler. Vous êtes deux femmes vraiment exceptionnelles que j'ai apprécié côtoyer au quotidien. Lisiane, promis je ne dirai rien à Fred pour ta liaison avec le gel Doc. Quant à Anne-Marie on reparlera plus tard des cuissardes blanches. Je ne peux pas citer tout le monde, mais je remercie évidemment le reste de l'équipe SIMPA pour leur soutien, leur écoute et leur aide lors de nos réunions mais aussi pour nos échanges moins scientifiques mais fort sympathiques lors des repas de labo organisés notamment en fin d'année.

- J'ai également reçu une aide précieuse venue d'ailleurs (pas SIMPA mais quand même) :

Il me paraît évident de te remercier, Stéphanie GRANDEMANGE. Déjà parce que tu vas me taper si je ne le fais pas, mais aussi parce que tu me suis maintenant depuis la licence et sans toi je n'en serai peut-être pas là. Tu as toujours eu un œil bienveillant qui m'a permis d'avancer. Tu as accepté sans hésiter (enfin je crois) de faire parti de mon comité de suivi de thèse et tu as rempli ton rôle au-delà de ce que l'on pouvait te demander. En plus d'émettre quelques conseils pour avancer dans mon projet, tu n'as pas hésité à m'aider dans mes « manips » et à me faire profiter des tes compétences. Je ne sais pas comment je peux te remercier, mais je sais que j'ai eu de la chance de te croiser. Je profite de ce petit passage dans le labo de Stéph pour remercier aussi Claire Barbieux. Nous nous suivons et entre-aidons dans nos études depuis le M1. Tu es quelqu'un de géniale, merci pour ton aide et ton soutien.

Une autre personne a été importante au cours de ces dernières années et il s'agit de David DUBAYLE. On ne se connaissait pas avant de commencer ma thèse mais je suis ravi d'avoir fait ta connaissance. Tu as accepté de faire parti de mon comité de suivi de thèse et comme Stéph, tu m'as aidé au-delà de ce qu'on pouvait te demander. Tu as pris de ton temps pour me former dans ton labo sur une technique, tu m'as régulièrement appelé pour savoir comment j'allais et pour prendre des nouvelles de l'avancée de mon projet. Le contact s'est fait de manière évidente entre nous et j'apprécie beaucoup. Merci vraiment pour ton aide David.

Je remercie également Robert, avec qui nous avons fait toutes nos études comportementales. Vous avez eu la patience de m'expliquer certaines subtilités de

ce domaine de recherche et vous avez réussi à me montrer que les analyses de comportements ne sont pas subjectives (comme je pouvais le penser).

Je tiens aussi à remercier Justine PAOLI du service commun de microscopie, ainsi que Huguette LOUIS de la plateforme de cytométrie en flux pour leur aide, leur gentillesse et leur disponibilité. Travailler avec vous ces dernières années a été un vrai plaisir.

J'oublie sûrement plein de personnes et je m'en excuse. Mais je remercie évidemment toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce projet.

Un grand merci également à la faculté d'odontologie de Nancy pour m'avoir accepté, avec une pensée particulière pour Viviane qui a géré mon dossier ces 4 dernières années. Vous êtes vraiment extraordinaire, je vous remercie pour vos sourires, bises et autres attentions que vous avez eu à mon égard.

Outre l'aspect scientifique, je remercie aussi tout mon entourage, famille et ami(e)s pour avoir su me soutenir mais aussi me changer les idées quand j'en avais besoin (et j'en ai eu besoin). Je remercie ma sœur, Virginie, pour m'avoir poussé dès le lycée à continuer mes études. Quelques part, cette thèse, je te la dois.

Je ne peux m'empêcher d'avoir une petite pensée pour mon père ... tu n'es plus là mais merci pour tout papa.

Je n'oublie pas non plus le soutien sans faille de ma princesse, ma mère, mon frère, Gaëtan, Alicia, Tiatia, Max, Pauline, Dorothee, Fab, Romu, Pierre, Laure (et j'en oublie). Merci à vous pour m'avoir montré qu'il y a une vie à coté de la thèse.

Sincèrement, un grand merci à toutes ces personnes sans qui je ne présenterai sûrement pas ce projet de thèse aujourd'hui.

Et merci aux quelques courageux qui ont réussi à lire ces remerciements jusqu'au bout. Je ne sais pas ce qu'il y avait dans votre verre avant de vous installer mais ça devait être bon !

Guillaume

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des abréviations | 10 |
| I – Introduction | 15 |
| 1 – La Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) | 15 |
| 1.1 – La CRH et la famille des urocortines | 15 |
| 1.2 – Les récepteurs à la CRH et leurs isoformes..... | 17 |
| 1.3 – Localisation des récepteurs à la CRH au sein du SNC | 19 |
| 1.4 – Les voies de signalisation activées par l’activation des CRH-R | 24 |
| 2 – La CRH et les glucocorticoïdes : deux régulateurs majeurs de la réponse au stress | 26 |
| 2.1 – Importance du stress dans la société..... | 26 |
| 2.2 – Généralités sur le stress..... | 27 |
| 2.3 – Mise en place de la réponse au stress | 29 |
| 2.4 – Action de la corticostérone en cas de stress | 31 |
| 3 – Rôle du système CRH/CRH-R1 au niveau du SNC | 36 |
| 3.1 – Impact de la CRH au niveau de l’hippocampe | 37 |
| 3.2 – Impact de la CRH au niveau du cervelet | 38 |
| 3.3 – Controverse sur l’action de la CRH au niveau du SNC | 40 |
| 4 – Passage de la CRH du SNC vers la périphérie | 41 |
| 4.1 – La barrière hémato-encéphalique (BHE) | 41 |
| 4.2 – Passage de la CRH à travers la BHE..... | 42 |
| 5 – Le système immunitaire (SI)..... | 43 |
| 5.1 – Généralités sur le SI | 43 |
| 5.2 – Activation et rôle des L _T dans la réponse adaptative..... | 45 |
| 5.3 – Activation et rôle des L _B dans la réponse adaptative..... | 46 |
| 5.4 – Les cytokines : messagers de la réponse immunitaire..... | 48 |
| 6 – La CRH, acteur des interactions entre les SNC et SI..... | 50 |
| 6.1 – Présence des récepteurs à la CRH sur les cellules du SI..... | 50 |
| 6.2 – Rôles direct et indirect de la CRH dans l’inflammation..... | 51 |
| 6.3 – Impact de la CRH sur l’immunité adaptative | 52 |
| 6.3.1 – Impact de la CRH sur le thymus et la rate | 52 |
| 6.3.2 – Impact de la CRH sur les lymphocytes du sang périphérique | 53 |
| 7 – Régulation du SNC par le SI | 55 |
| 7.1 – Interactions entre le SI et le SNC | 55 |
| 7.2 – Rôle du SI dans les régulations de la réponse au stress..... | 56 |

| | |
|--|-----------|
| II – Objectifs du projet | 58 |
| III – Matériels et méthodes pour la partie neurosciences | 60 |
| 1 – Animaux | 60 |
| 2 – Solutions et protocoles d’injection..... | 60 |
| 3 – Etudes comportementales | 61 |
| 3.1 – Test du labyrinthe en croix surélevé..... | 61 |
| 3.2 – Test d’émergence | 62 |
| 3.3 – L’actimètre..... | 62 |
| 3.4 – Test de la poutre..... | 63 |
| 3.5 – Test du cintre..... | 63 |
| 3.6 – Test du rotarod..... | 64 |
| 3.7 – Test du labyrinthe aquatique de Morris | 64 |
| 4 – Coupes histologiques de cerveau et marquage histochimique de la cytochrome C oxidase (COX)..... | 65 |
| 5 – Dosage de la corticostérone sérique | 66 |
| 6 – Extractions des ARNs et transcription inverse | 67 |
| 6.1 – Extractions des ARNs avec du Trizol | 67 |
| 6.2 – Extractions des ARNs sur des colonnes d’affinité | 68 |
| 6.3 – Transcription inverse des ARNm..... | 69 |
| 7 – PCR quantitative en temps réel (qPCR) | 69 |
| 8 – Analyses statistiques | 70 |
| IV – Résultats et discussions pour la partie neurosciences..... | 71 |
| 1 – Une exposition chronique à la corticostérone altère l’expression du CRH-R1 dans le cervelet et compromet les capacités motrices chez la souris | 71 |
| 1.1 – Impact d’une exposition chronique à la corticostérone sur l’expression de différents marqueurs impliqués dans la réponse au stress et sur l’activité métabolique du SNC..... | 71 |
| 1.2 – Impact d’une exposition chronique à la corticostérone sur les capacités locomotrices et d’apprentissage chez la souris..... | 75 |
| 1.3 – Discussion | 78 |
| 2 – L’inhibition du CRH-R1 augmente les capacités motrices des souris ayant subi une exposition chronique à la corticostérone | 86 |
| 2.1 – Impact de l’inhibition du CRH-R1 sur les capacités de coordination locomotrice lors d’une exposition chronique à la corticostérone | 86 |
| 2.2 – Discussion | 89 |

| | |
|---|------------|
| V – Matériels et méthodes pour la partie immunologie..... | 93 |
| 1 – Animaux | 93 |
| 2 – Culture cellulaire..... | 93 |
| 2.1 – Stimulation in vitro de splénocytes murins | 93 |
| 2.2 – Purification des lymphocytes B (L _B) murins par sélection négative | 94 |
| 2.3 – Stimulation in vitro de L _B purifiés | 94 |
| 3 – Analyses par cytométrie en flux (FACS) | 95 |
| 3.1 – Analyses effectuées sur les splénocytes totaux..... | 95 |
| 3.2 – Analyses sur les L _B purifiés | 96 |
| 4 – Extraction de protéines et Western blotting (WB)..... | 96 |
| 5 – Marquage par immunofluorescence (IF) | 98 |
| 6 – Extractions des ARNs et transcription inverse | 99 |
| 6.1 – Extractions des ARNs avec du Trizol | 99 |
| 6.2 – Transcription inverse des ARNm..... | 99 |
| 7 – PCR quantitative en temps réel (qPCR) | 100 |
| 8 – Extraction sur gel d’agarose et séquençage..... | 100 |
| 9 – Puce « phospho MAPKs proteome arrays »..... | 101 |
| 10 – Analyses statistiques..... | 102 |
| VI – Résultats et discussion pour la partie immunologie..... | 103 |
| 1 – Impact de la CRH sur les splénocytes murins : baisse de la viabilité des lymphocytes B | 103 |
| 1.1 – Effet de la CRH sur la viabilité et la production de cytokines des splénocytes murins | 103 |
| 1.2 – Expression du CRH-R sur les L _B murins..... | 105 |
| 1.3 – Voie(s) de signalisation activée(s) par la CRH sur les L _B | 107 |
| 1.4 - Discussion | 108 |
| VII – Discussion générale et perspectives | 113 |
| VIII - Références bibliographiques | 119 |

Liste des abréviations

8-OHdG = 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine

11 β -HSD = 11 bêta hydroxystéroïde déshydrogénase

Ac = anticorps

ACTH = hormone hypophysaire adrénocorticotrope

AD = dermatite atopique

ADN = acide désoxyribonucléique

ADNc = ADN complémentaire

Ag = antigène(s)

AMP = adénosine monophosphate

AMPC = AMP cyclique

Ant = antalarmine

APC = allophycocyanine

ATP = adénosine triphosphate

ARN = acide ribonucléique

ARNm = ARN messenger

Bad = 2-associated death promoter (protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2)

Bax = Bcl2-associated X protein (protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2)

Bcl-2 = « B cell lymphoma 2 » (famille de protéine pro-apoptotique)

BCR = récepteur des cellules B

BDNF = « brain-derived neurotrophic factor » (facteur neurotrophique dérivé du cerveau)

BET = bromure d'éthidium

BHE = barrière hémato-encéphalique

BM = noyau basomédian de l'amygdale

BL = noyau basolatéral de l'amygdale

BST = noyau du lit de la strie terminale

BSA = albumine de sérum bovin

CA = corne d'Ammon

CeA = noyau central de l'amygdale

CD = cluster de différenciation

cm = centimètre

CM/CL = noyaux centro-médian et centro-latéral du thalamus
CMH I = complexe majeur d'histocompatibilité de classe I
Cortico = corticostérone
COX = cytochrome C oxidase
CPA = cellule(s) présentatrice(s) d'Ag
CPu = noyau caudé/putamen (forment le striatum)
CREB = protéine se fixant aux éléments de réponse à l'AMPc
CRF = Corticotropin-releasing factor
CRH = Corticotropin-releasing hormone
CRH-BP = « CRH binding protein » (protéine fixant la CRH)
CRH-KO = CRH-knockout (souris n'exprimant pas la CRH)
CRH-OE = souris transgénique surexprimant la CRH
CRH-tg = CRH transgénique (souris surexprimant la CRH)
CRH-R = récepteur à la CRH
CRH-R1 = récepteur de type 1 à la CRH
CRH-R2 = récepteur de type 2 à la CRH
CSR = commutation de classe des Ig
DAB = 3,3'-Diaminobenzidine Tétrahydrochloride
DLT = dépression à long terme
DMSO = diméthyl sulfoxyde
dNTP = désoxyribonucléotide triphosphate
DTT = dithiothréitol
ELISA = enzyme linked immunosorbent assay (essai d'immunoabsorption enzymatique)
ERK = extracellular signal-regulated kinase (kinase régulant les signaux extracellulaires)
FasL = ligand de Fas
FACS = fluorescence-activated cell sorting (Cytométrie en flux)
FZ = zone folliculaire
GABA = acide γ -aminobutyrique
GSK3 β = glycogen synthase kinase 3 beta (glycogène synthase kinase 3 bêta)
GR = récepteur aux glucocorticoïdes
h = heure
H₂O up = eau ultra pure

HHS = hypothalamo-hypophyso-surrénalien
HMS = hypermutation somatique
HRP = horseradish peroxydase (péroxydase du raifort)
HS = sclérose hippocampique
IFN = interféron
Ig = immunoglobuline
IL = interleukine
INRS = institut national de la recherche et de la sécurité
I¹²⁵-CRH = CRH couplé à de l'iode 125
IRMf = imagerie par résonance magnétique fonctionnelle
JNK = c-Jun NH2-terminal kinase
Kd = constante de dissociation
Kg = kilogramme
L_B = lymphocyte B
LBE = lymphocyte B effecteur
LBM = lymphocyte B mémoire
LCR = liquide céphalo-rachidien
L_T = lymphocyte T
L_{Tc} = lymphocyte T cytotoxique
L_{Th} = lymphocyte T « helper »
L_{Treg} = lymphocyte T régulateur
LTE = L_T effectrice
LTM = L_T mémoire
LPS = lipopolysaccharide
M = molaire
M-MLV = Moloney murine leukemia virus
MAPK = mitogen-activated protein kinase (protéine kinase activée par des mitogènes)
mg = milligramme
min = minute
mL = millilitre
mM = millimolaire
mTOR : mammalian target of rapamycin (cible de la rapamycine chez les mammifères)
MZ = zone marginale
N/E = cadran nord/est dans le labyrinthe aquatique de Morris

nGRE = élément de réponse négatif des récepteurs aux glucocorticoïdes

NK = cellule « natural killer » (tueuse naturelle)

nM = nanomolaire

Pa = noyau paraventriculaire du thalamus

PBL = peripheral blood lymphocyte (lymphocytes du sang périphérique)

PBMC = cellules mononucléaires du sang périphérique

PBS = tampon phosphate de sodium

PC = cellule de Purkinje

PC7 = phycoérythrine-cyanine 7

PCR = réaction de polymérisation en chaîne

pCRH = CRH placentaire

PE = phycoérythrine

PET = tomographie par émission de positons

PI3K = phosphoinositide 3 kinase

Po = noyau postérieur du thalamus

PKA = protéine kinase A

PLT = potentialisation à long terme

POMC = pro-opiomélanocortine

PVN = noyau paraventriculaire

qPCR = PCR quantitative en temps réel

RCPG = récepteur couplé à une protéine G

RIA = radioimmunoassay

rpm = rotation par minute

RT = reverse transcription (transcription inverse)

S1 = cortex primaire sensoriel

Sec = seconde

SI = système immunitaire

SNC = système nerveux central

SN = substance noire

SNc = substance noire compacta

SNr = substance noire réticulée

TBS = tampon Tris base

TBST = TBS avec du Tween 20

TCR = récepteur des cellules T

TGF β = « tumor growth factor beta » (facteur de croissance tumorale bêta)

TLR = récepteur de type Toll

TMB = tétraméthylbenzidine

TNF α = tumor necrosis factor alpha (facteur de nécrose tumorale alpha)

UCNs = urocortines

μg = microgramme

μL = microlitre

μM = micromolaire

V = volt

VA = noyau ventro-antérieur du thalamus

VAL = noyau ventro-antérolatéral du thalamus

VL = noyau ventro-latéral du thalamus

VM = noyau ventro-médian du thalamus

VP = noyau ventro-postérieur du thalamus

VP/SI = pallidum ventral et substance innominata des ganglions de la base

VPL = partie latérale des noyaux ventro-postérieurs du thalamus

VPM = partie médiane des noyaux ventro-postérieurs du thalamus

WB = western blot

I – Introduction

1 – La Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)

1.1 – La CRH et la famille des urocortines

La corticotropin-releasing hormone (CRH), encore appelée corticolibérine, est un peptide de 41 acides aminés dont l'existence a été mise en évidence en 1955. Ce n'est que quelques années plus tard, en 1979, que sa structure fut décrite ([Lovejoy et al., 2014](#)). Sa principale source est l'hypothalamus et son rôle dans la réponse au stress fut décrit pour la première fois dans les années 1980 au cours d'une étude chez le mouton visant à comprendre le rôle de l'hypothalamus dans les régulations de la sécrétion de l'hormone hypophysaire adrénocorticotrope (ACTH), ([Vale et al., 1981](#)). Lors de cette étude, une importante fixation de la CRH fut observée au niveau de l'hypophyse suggérant un rôle de ce peptide dans l'activation hypophysaire. Ces observations faites ensuite aussi bien chez l'humain que chez le rat ont permis de mettre en évidence le rôle de l'hypothalamus dans la régulation de la production de certaines hormones hypophysaires ([De Souza et al., 1984, 1985](#)). A cette époque, le rôle de la CRH n'était pas encore connu et ce n'est qu'à la suite de ces études que la CRH fut identifiée comme étant un régulateur important de la réponse au stress.

Dans un premier temps, ce peptide fut appelé « corticotropin-releasing factor » (CRF) car seule une action paracrine et autocrine lui était attribuée. Mais, au fur et à mesure du temps, il s'est avéré que son action ne se limitait pas simplement à la stimulation de l'hypophyse, ni même au système nerveux central (SNC). Ce peptide fut alors rebaptisé CRH (corticotropin-releasing hormone), au vu de ses capacités à passer dans le sang pour avoir une action endocrine. Bien que cette action soit maintenant avérée, ce peptide garde encore aujourd'hui ses deux appellations « CRF » et « CRH ».

La principale source de production de la CRH se situe au niveau du noyau paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus. Toutefois, cette structure n'est pas la seule à produire de la CRH car il existe une production au niveau d'autres structures. Par exemple, des études réalisées sur des rongeurs ont montré une production de

CRH au niveau de l'hippocampe (Chen et al., 2001) et du cervelet (Sawada et al., 2008) où elle agirait comme neuromodulateur. En plus du SNC, il existe une production endogène, bien que faible, au niveau de certains systèmes périphériques tels que le cœur, le thymus ou encore la rate (Aird et al., 1993).

La CRH est un peptide qui fait partie de la grande famille des urocortines (UCNs). Cette famille se compose actuellement de 5 protéines qui sont les urocortines 1, 2 et 3 (respectivement UCN1, UCN2 et UCN3), la « CRH binding protein » (CRH-BP) ainsi que la CRH. Alors que la CRH a été découverte en 1955, ce n'est qu'en 1995 que l'UCN1 a été identifiée chez le rat. Ce peptide de 38 acides aminés possède 45% d'homologies de séquences en acides aminés avec la CRH (Vaughan et al., 1995). Le rôle de ce peptide n'est pour l'instant pas clairement identifié dans la réponse au stress. Toutefois, il semblerait que comme la CRH, l'UCN1 soit capable d'induire l'expression de l'ACTH au niveau de l'hypophyse. Par contre, l'activation de l'hypophyse par l'UCN1 ne semble pas induire un état anxiogène (Tsatsanis et al., 2007). Des études sur des souris n'exprimant pas l'UCN1 (Zalutskaya et al., 2007) suggèrent un rôle important de la protéine dans l'adaptation lors de l'exposition à des conditions de stress, sans pour autant intervenir dans la mise en place de la réponse au stress.

En 2001, les UCN2 et UCN3 furent découvertes, venant ainsi compléter la famille des UCNs (Lewis et al., 2001; Reyes et al., 2001). Tout comme pour l'UCN1, les rôles de ces deux UCNs ne sont pas clairement identifiés dans la réponse au stress. Il a été montré aussi bien chez le rat que chez la souris que l'injection d'UCN2 au niveau des ventricules cérébraux induit une anxiété (Pelleymounter et al., 2004; Skórzewska et al., 2011). A l'inverse des trois autres UCNs (UNC1, UCN2 et la CRH), l'injection d'UCN3 semble plutôt avoir un effet anxiolytique (Tanaka et al., 2011). Pour résumer, il semble donc que les UCNs puissent intervenir dans la régulation de la réponse au stress, mais la CRH reste le régulateur majeur de cette réponse en condition de stress.

La CRH-BP est une protéine de 37 kDa qui a la particularité de pouvoir fixer la CRH et les UCN1, 2 et 3 avec une forte affinité (Kd de l'ordre de 0,1 à 1,7 nM). Cette protéine a initialement été découverte chez l'Homme sous forme circulante dans le sang (Orth and Mount, 1987), mais a également été retrouvée chez les Primates et les Rongeurs. Toutefois, la CRH-BP n'a pas été retrouvée dans la circulation

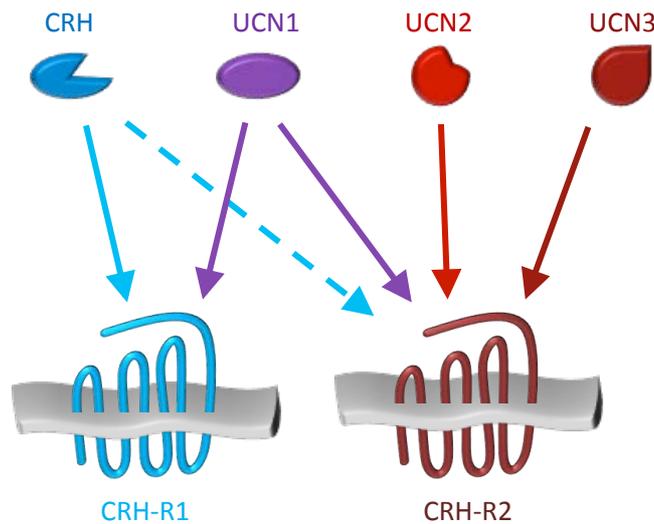


Fig 1 : Interactions entre la CRH, les urocortines et leurs récepteurs

La corticotropin-releasing hormone (CRH) ainsi que les différentes urocortines (UCN1, UCN2 et UCN3) sont capables de se fixer sur deux récepteurs différents, le CRH-R1 et le CRH-R2. L'affinité des différents peptides n'est pas la même pour les deux récepteurs. La CRH a une affinité plus importante pour le CRH-R1 que pour le CRH-R2. L'UCN1 est capable de se fixer avec une bonne affinité à la fois sur le CRH-R1 et le CRH-R2, alors que les UCN2 et UCN3 sont capables de se fixer uniquement sur le CRH-R2 et n'ont aucune affinité (ou très faible) pour le CRH-R1.

Flèche pleine : fixation avec une bonne affinité ; flèche en pointillés : fixation avec une affinité modérée.

systemique des Rongeurs. Il semblerait donc que chez ces derniers, cette protéine soit présente uniquement dans l'encéphale, plus particulièrement au niveau du cerveau antérieur, du cervelet et de l'hypophyse. Des analyses réalisées par hybridation des ARN n'ont pas permis de révéler la présence de CRH-BP en dehors du SNC (Potter et al., 1991, 1992). Le fait que ce peptide lie la CRH et les trois UCNs, diminuant ainsi leur fixation aux récepteurs, pose la question d'un rôle éventuel de la CRH-BP dans la régulation de la réponse au stress. C'est pourquoi, différentes études sur deux lignées de souris surexprimant la CRH-BP et un troisième modèle de souris qui au contraire n'exprimait plus cette protéine, ont été menées. Les résultats n'ont pas montré d'altération de la réponse au stress (Seasholtz et al., 2001). La CRH-BP ne semble donc pas être un acteur majeur dans la régulation de celle-ci. Toutefois, il s'avère que dans les modèles de souris surexprimant la CRH-BP, une augmentation de l'expression de la CRH a été observée. Cette augmentation pourrait compenser la séquestration plus importante de la CRH par la CRH-BP, de sorte que le taux de CRH « libre » resterait constant. Une telle compensation pourrait expliquer que la réponse au stress ne soit pas altérée même lors d'une surexpression de la CRH-BP.

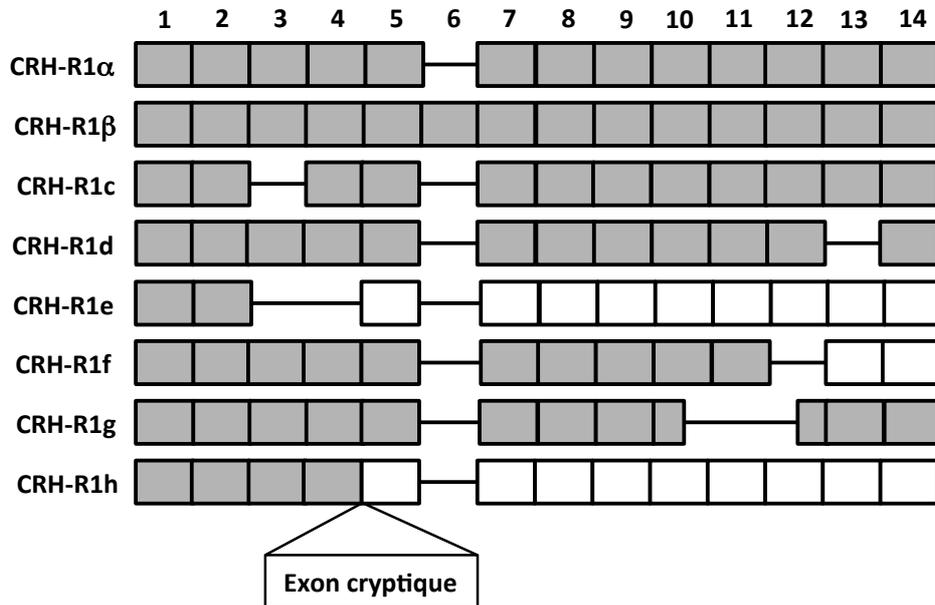
1.2 – Les récepteurs à la CRH et leurs isoformes

L'action biologique de la CRH et des trois UCNs se fait via deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à une protéine G (RCPG) : le récepteur de type 1 (CRH-R1) et le récepteur de type 2 (CRH-R2).

Le CRH-R1 a été cloné et séquencé pour la première fois chez l'humain en 1993 (Chen et al., 1993) et le CRH-R2 en 1995 chez la souris (Kishimoto et al., 1995; Perrin et al., 1995). Ces deux récepteurs possèdent une homologie de séquences en acides aminés de plus de 70% aussi bien chez l'Homme que chez les Rongeurs. Cette homologie de séquences aussi importante viendrait du fait que les gènes codant ces deux protéines sont issus de la duplication d'un gène ancestral commun (Cardoso et al., 2014).

Bien qu'il existe deux récepteurs différents pouvant fixer la CRH et les UCNs, ces différents peptides ne se fixent pas de la même façon à ces deux récepteurs. Des analyses d'affinité, réalisées aussi bien chez l'Homme que chez les Rongeurs, ont

Humain :



Souris :

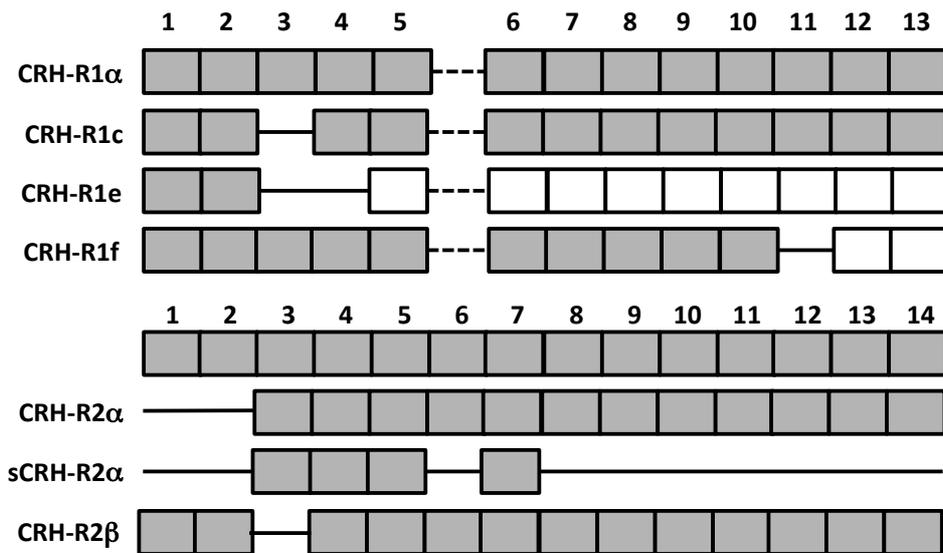


Fig 2 : Schéma des différentes isoformes des CRH-R1 et CRH-R2 (humains et murins) et de leurs épissages alternatifs (d'après Pisarchik and Slominski, 2001 et Chen et al. 2005)

Représentation des différentes isoformes décrites pour les CRH-R1 et CRH-R2 chez l'humain et la souris. Chiffres : numéro des exons ; carrés gris : exons présents dans l'isoforme ; carré blanc : exon présent après un décalage du cadre de lecture ; traits noirs : exons éliminés par épissage alternatif ; trait en pointillé : homologue de l'exon 6 chez l'Homme non détecté chez la souris.

permis d'évaluer les constantes de dissociation (K_d) des différents peptides pour les CRH-R1 et CRH-R2. Ces analyses ont montré que l'UCN1 a une forte affinité pour les deux types de récepteurs avec des constantes de dissociation (K_d) variant de 0,5 à 2 nM permettant donc l'activation indifféremment du CRH-R1 et du CRH-R2. En revanche, la constante de dissociation des UCN2 et UCN3 est bien plus faible pour le CRH-R2 (K_d de l'ordre de 1 à 2 nM) que pour le CRH-R1 (K_d supérieur à 100 nM) indiquant leur forte affinité pour le CRH-R2 et leur faible affinité pour le CRH-R1. Avec une constante de dissociation supérieure à 100 nM, physiologiquement, ces deux UCNs (UCN2 et UCN3) ne semblent pas pouvoir se fixer au CRH-R1. Pour la CRH, ces études ont montré qu'elle a une constante de dissociation de l'ordre de 3 nM pour le CRH-R1, et de 10 à 40 nM pour le CRH-R2. L'affinité de la CRH est donc plus importante pour le CRH-R1 que pour le CRH-R2. Toutefois, la molécule peut tout de même se fixer à ce dernier en conditions physiologiques (Fig 1 ; Grace et al., 2007; Reul and Holsboer, 2002; Tsatsanis et al., 2007).

Pour chacun des deux gènes codant les CRH-R1 et CRH-R2, différents épissages alternatifs permettant l'expression de différentes isoformes, ont pu être mis en évidence aussi bien chez l'Homme que chez les Rongeurs.

Pour le CRH-R1, huit isoformes différentes ont été décrites à ce jour chez l'humain, contre quatre chez la souris (Fig 2, Pisarchik and Slominski, 2001; Zmijewski and Slominski, 2009). Dans les deux espèces, le CRH-R1 α reste la forme majoritairement exprimée. Chez la souris, le tissu exprimant le plus d'isoformes différentes pour le CRH-R1 semble être la peau. En effet, les quatre isoformes CRH-R1 α , c, e et f sont exprimées au niveau de la peau pendant la phase « anagène ». Par contre, seules les isoformes CRH-R1 α et CRH-R1e semblent être exprimés au niveau de l'encéphale alors que dans la rate, ce sont les deux isoformes CRH-R1 α et CRH-R1c qui sont présentes, toujours avec une majorité de CRH-R1 α . Ces deux isoformes, α et c, possèdent bien tous les domaines transmembranaires, mais avec une délétion de l'exon 3 pour le CRH-R1c. Or, la partie protéique codée par l'exon 3 est très importante pour une bonne fixation de la CRH au CRH-R1 comme l'ont montré les analyses de mutagenèse dirigée. En effet, en ciblant spécifiquement différentes parties du CRH-R1, une forte baisse de la liaison de la CRH au CRH-R1 a été observée chez les mutants ciblant l'exon 3 (Wille et al., 1999). Au niveau de la

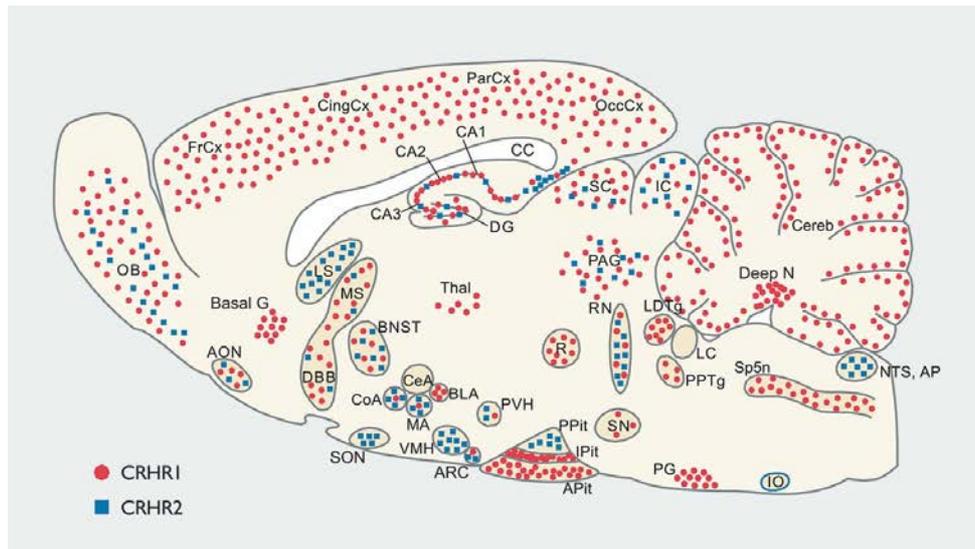


Fig 3 : Répartition des CRH-R1 et CRH-R2 au sein du cerveau de souris
(D'après Reul et al, 2002)

Détection par hybridation *in situ* des ARNm de CRH-R1 et CRH-R2 au sein des différentes structures du cerveau murin.

Basal G : ganglions de la base ; **Thal** : thalamus ; **CeA/BLA/CoA/MA** : noyaux de l'amygdale ; **PVH/VMH** : noyaux de l'hypothalamus ; **BNST (= BST)** : noyau du lit de la strie terminale ; **CA1/CA2/CA3/DG** : régions de l'hippocampe ; **Cx** : cortex ; **SN** : substance noire ; **Cereb** : cervelet ; **Deep N** : noyaux cérébelleux ; **PPit/IPit/APit** : régions de l'hypophyse ; **OB** : bulbe olfactif ; **LS/MS** : septum latéral et médian ; **SON** : noyau supraoptique.

rate, il semblerait donc que la CRH puisse principalement se fixer sur le CRH-R1 α et peu sur le CRH-R1c (en plus d'une éventuelle action via le CRH-R2).

Pour le CRH-R2, seules deux isoformes ont été décrites à ce jour chez la souris : le CRH-R2 α et le CRH-R2 β . Ces deux isoformes, exprimées par un même gène de 14 exons, varient par la présence ou non des deux premiers exons. Pour le CRH-R2 β , les exons 1 et 2 sont directement reliés à l'exon 4, avec une délétion de l'exon 3 alors que pour le CRH-R2 α , l'isoforme démarre à l'exon 3 avec une délétion des exons 1 et 2. En plus de ces deux isoformes, une forme soluble du CRH-R2 α (sCRH-R2 α) a été décrite au niveau de l'encéphale. Tout comme le CRH-R2 α , le sCRH-R2 α ne possède pas les exons 1 et 2, mais il ne possède pas non plus d'exon 6 et l'exon 7 est son dernier exon transcrit. Les exons 8 à 14 ne sont donc pas présents dans cette isoforme, ce qui explique qu'elle ne possède pas de parties membranaires et qu'elle soit soluble (Chen et al., 2005a, 2005b). Chez l'humain, au delà des deux isoformes CRH-R2 α et CRH-R2 β connues, un troisième variant a été décrit : le CRH-R2 γ . La particularité de ces trois isoformes est qu'elles possèdent chacune un promoteur spécifique (Gao et al., 2007).

1.3 – Localisation des récepteurs à la CRH au sein du SNC

Après la caractérisation de la CRH et de ses récepteurs réalisées à partir des années 1980, des études ont été menées afin de localiser la présence des récepteurs à la CRH (CRH-R) au sein du SNC. D'après une première cartographie établie par hybridation *in situ* des ARNm en 1994 (Potter et al., 1994), il apparaît que ces CRH-R sont présents dans l'hypothalamus mais aussi dans de nombreuses structures du SNC comme le cortex cérébral, les bulbes olfactifs, le thalamus ou encore certains noyaux du tronc cérébral. En 2002, des analyses plus fines ont permis de distinguer la répartition des CRH-R1 et des CRH-R2 au sein de l'encéphale des Rongeurs (Fig 3 ; Reul and Holsboer, 2002).

Il s'avère que les CRH-R1 sont en quantité importante au niveau de l'encéphale, notamment au niveau des différentes structures impliquées dans la régulation des fonctions sensori-motrices et cognitives. Chez les Primates et les Rongeurs, indépendamment du cortex cérébral, sa présence a été mise en évidence au niveau du cervelet, des ganglions de la base, des différents noyaux du thalamus ainsi qu'au

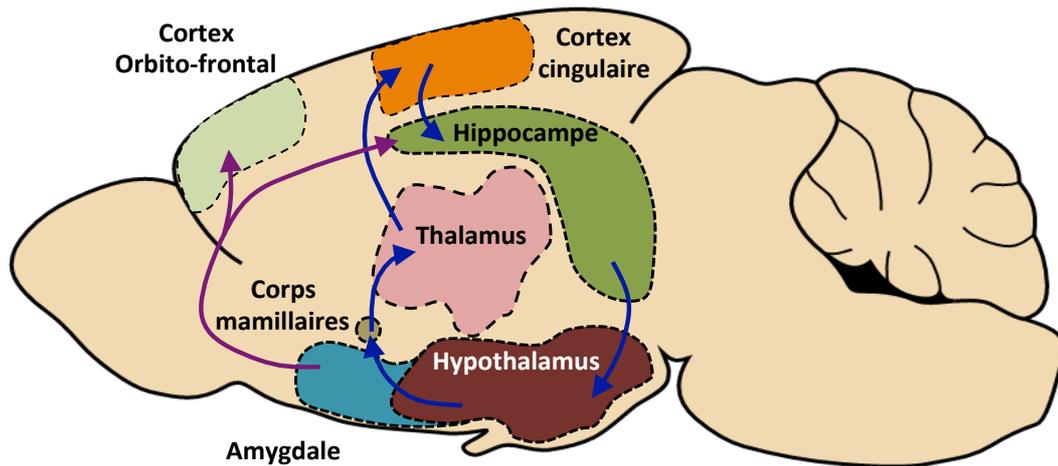


Fig 4 : Structures du système limbique.

Schéma fonctionnel des boucles impliquées dans la régulation des fonctions cognitives et émotionnelles. Une première boucle (flèches bleues) se compose du cortex cingulaire qui se projette au niveau de l'hippocampe. Ce dernier se projette ensuite, via la fornix, au niveau des corps mamillaires (parties de l'hypothalamus). Les corps mamillaires se projettent ensuite au niveau du thalamus, qui fait relais au niveau du cortex cingulaire. La deuxième boucle (flèches violettes) se compose des interconnexions entre l'amygdale, l'hippocampe et le cortex orbito-frontal.

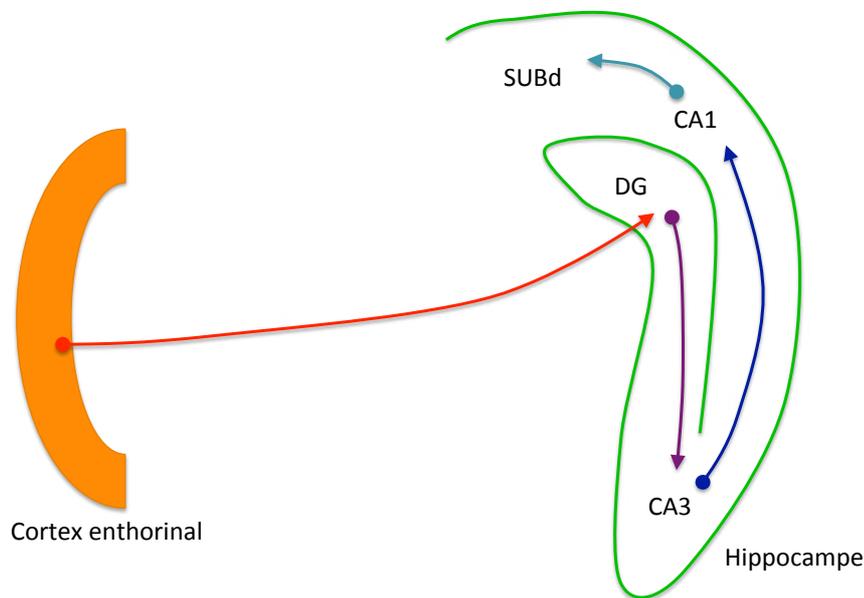


Fig 5 : Structure et connexions de l'hippocampe murin

Schéma fonctionnel des connexions unidirectionnelles partant du cortex enthorinal vers le gyrus denté (DG), qui se projettent ensuite vers le domaine CA3, puis CA2/CA1 pour ensuite sortir par le subiculum dorsal (SUBd).

niveau du système limbique étroitement lié à la régulation du stress ([Kostich et al., 2004](#); [Reul and Holsboer, 2002](#)).

Notre projet ciblant les fonctions sensori-motrices, notre étude se focalisera plus précisément sur ces régions. Parmi les différentes régions de l'encéphale exprimant les CRH-R, quatre grands réseaux de connexions se dégagent :

- les CRH-R sont présents au niveau des différentes structures du système limbique formé grossièrement en deux circuits fonctionnels interconnectés, le premier impliquant l'amygdale, le septum et le cortex orbito-frontal, le second formant le circuit de Papez, boucle neuroanatomique entre le cortex cingulaire et la formation hippocampale ([Fig 4](#)). Ces deux circuits sont connus pour leur rôle primordial dans la gestion des émotions, qu'elles soient positives ou négatives (la peur, l'anxiété, l'agressivité ou le plaisir) et des fonctions cognitives telles que l'apprentissage et la mémorisation.

L'hippocampe est intégré dans « la formation hippocampale » qui comprend l'hippocampe à proprement dit (le gyrus denté et la corne d'Ammon), le subiculum et le cortex entorhinal. Ces différentes structures sont reliées entre elles par des projections unidirectionnelles du cortex entorhinal au gyrus denté. Ce dernier, en tant que principale voie afférente de l'hippocampe, se projette ensuite au niveau du domaine CA3, qui se projette à son tour sur le domaine CA1. Les projections partant du domaine CA1 partent ensuite vers le subiculum dorsal, principale voie de sortie des informations provenant de l'hippocampe ([Fig 5](#)). Cette structure a été très étudiée pour son rôle dans les capacités d'apprentissage ainsi que pour son rôle dans la mémorisation à long terme ([Bannerman et al., 2014](#); [Battaglia et al., 2011](#); [Yonelinas, 2013](#)). Certaines études tendent à montrer que les différentes fonctions gérées par cette structure peuvent être compartimentées au sein de l'hippocampe. Chez les Rongeurs, l'hippocampe ventral jouerait principalement un rôle dans la régulation du stress et des émotions, alors que l'hippocampe dorsal serait plutôt le siège de la mémoire spatiale et à long terme ([Fanselow and Dong, 2010](#)).

L'amygdale, ou corps amygdalien, se compose d'un ensemble de noyaux connus pour être impliqués dans la régulation des émotions, notamment la peur, l'anxiété et l'agressivité, l'amygdale est en étroite relation avec l'hippocampe et l'hypothalamus ([Davis and Shi, 2000](#)). Grâce à ses interactions, l'amygdale joue un

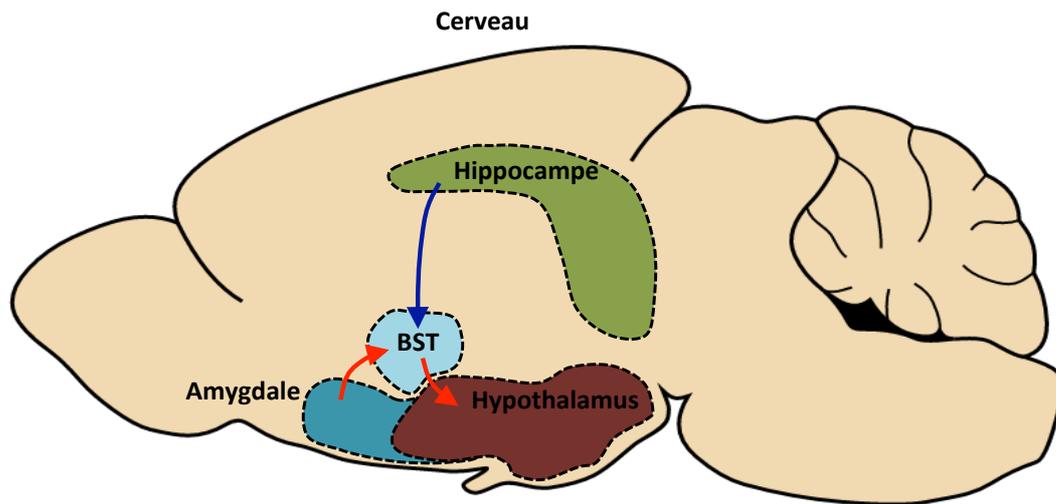


Fig 6 : Organisation et régulation de l'hypothalamus murin

Régulation multi-synaptique de l'activité de l'hypothalamus par le noyau du lit de la strie terminale (BST), l'amygdale et l'hippocampe.

Flèches rouges : projections GABAergiques ; flèche bleue : projection glutamatergique.

rôle dans « l'apprentissage par la peur » (ou « fear learning ») en conservant le souvenir des épisodes d'angoisse (Duvarci and Pare, 2014).

L'hypothalamus est connu pour intervenir dans différentes fonctions telles que la thermorégulation, les émotions, la régulation de l'appétit, la régulation du cycle circadien, le cycle ovarien ou encore la régulation de la réponse au stress (Blair, 2015; Saper and Lowell, 2014). En tant que centre de contrôle des fonctions végétatives, l'hypothalamus intervient dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme.

La présence des CRH-R sur l'ensemble de ces structures suggère un rôle de la CRH dans la régulation des fonctions cognitives.

- Les CRH-R sont présents au niveau des structures permettant la mise en place et la régulation de la réponse à un stress. Ces interconnexions se font notamment entre l'hypothalamus (centre producteur de la CRH, initiation de la réponse au stress) et l'hypophyse mais également avec l'hippocampe, l'amygdale et le noyau du lit de la strie terminale (BST, « bed stria terminalis »). En effet, des connexions multi-synaptiques, provenant de l'hippocampe et de l'amygdale, permettent de réguler l'activité du PVN de l'hypothalamus (Fig 6). Ces connexions passent par une structure intermédiaire, le BST qui envoie des fibres GABAergiques inhibitrices sur le noyau hypothalamique. Or, l'hippocampe active le BST par l'intermédiaire d'une projection glutamatergique activatrice. L'hippocampe favorise donc indirectement l'activité inhibitrice exercée sur le PVN. A l'inverse, l'amygdale se projette, par l'intermédiaire de fibres GABAergiques, sur le BST. Ces dernières vont donc inhiber l'activité du BST et ainsi lever l'inhibition que celui-ci exerce sur le PVN. Ainsi, contrairement à l'hippocampe, l'amygdale est capable de stimuler l'activité du PVN au sein de l'hypothalamus (Herman et al., 2003, 2004).

- Les structures intégrant les boucles de régulation motrice entre le cortex cérébral et les ganglions de la base expriment également ces CRH-R. Les ganglions de la base sont divisés en une partie dorsale motrice et une partie ventrale limbique. La partie motrice est constituée de plusieurs noyaux parmi lesquels se trouvent le noyau caudé, le putamen, le pallidum, le noyau subthalamique et la substance noire, noyau dopaminergique du mésencéphale. L'association du noyau caudé et du putamen forme le néostriatum (CPu, noyau caudé/putamen), qui constitue la

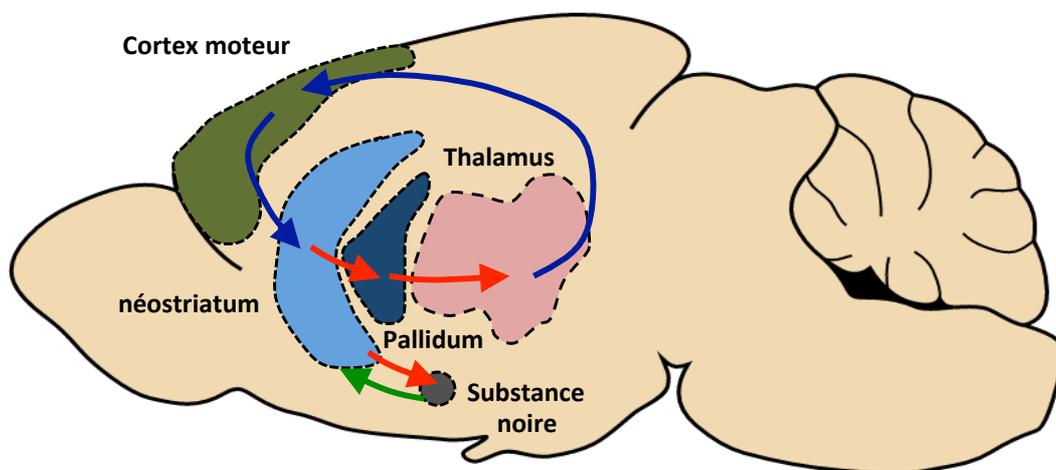


Fig 7 : Organisation des ganglions de la base au sein du SNC murin

Schéma de la « boucle motrice » des ganglions de la base. Différentes afférences des régions corticales se projettent au niveau du néostriatum, dont les afférences se projettent à leur tour au niveau du pallidum. Des afférences partent du pallidum vers le thalamus qui relaie l'information jusqu'au cortex moteur. En parallèle de cette boucle de régulation, des afférences dopaminergiques partent de la substance noire vers le néostriatum, qui régule en retour cette activation par des projections GABAergiques.

Flèches bleues : projections glutamatergiques ; flèches rouges : projections GABAergiques ; flèche verte : projections dopaminergiques.

principale voie d'entrée des afférences provenant des cortex moteurs, pré-moteurs et sensitifs situés au niveau des aires frontales, préfrontales et pariétales. Le pallidum ou paléostriatum, médial et latéral, représente la principale voie efférente qui peut s'effectuer de façon directe ou indirecte (via le noyau subthalamique) sur la substance noire (pars reticulata). Ces informations se projettent sur le thalamus (noyau VL), qui les relaie à son tour au cortex moteur pour la coordination et la planification du mouvement (Fig 7). La substance noire (SN, aussi appelé « locus niger ») se divise en deux parties : pars compacta (SNc) et pars réticulata (SNr). Ce noyau dopaminergique, fonctionne en boucle fermée avec le striatum : les afférences dopaminergiques stimulent le néostriatum qui, en retour, régule cet afflux par l'intermédiaire de projections GABAergiques qui inhibent la SN.

Les ganglions de la base font donc partie de « boucles motrices » qui agissent comme des boucles de rétroaction positive, facilitant l'activation de l'aire motrice secondaire en focalisant des signaux provenant d'une large région corticale. Toutefois, la plupart des afférences qui arrivent aux niveaux des ganglions de la base ne sont pas exclusivement motrices. En effet, certaines afférences, impliquées dans des fonctions cognitives et de mémorisation ou psychoaffectives, se projettent sur le striatum ventral formant la boucle limbique. (Bear et al., 2002; Graybiel and Grafton, 2015; Muhlert and Lawrence, 2015). Ces fonctions ont ainsi pu être mises en évidence par des études réalisées sur la maladie de Parkinson. Les personnes atteintes de cette maladie ont une atteinte neurologique progressive entraînant une diminution de l'apport en dopamine, produite principalement au niveau de la substance noire, au niveau du striatum. Cette atteinte neurologique est à l'origine d'altérations conduisant à la perte des fonctions motrices. Or, les patients atteints présentent également certains troubles cognitifs notamment au niveau de la mémoire procédurale inconsciente (Foerde and Shohamy, 2011). Il semble donc que la diminution de production de dopamine par la substance noire, altère des fonctions cognitives telle que la mémoire procédurale.

La présence de CRH-R (CRH-R1 et CRH-R2) au niveau du striatum, notamment chez la souris, suggère un rôle potentiel de la CRH dans le fonctionnement de cette structure. Chez la souris, l'injection de CRH dans le striatum provoque une diminution de dopamine au sein de la structure associée à une altération de l'activité locomotrice (Rybnikova et al., 1999; Shalyapina et al., 2003). La CRH semble donc

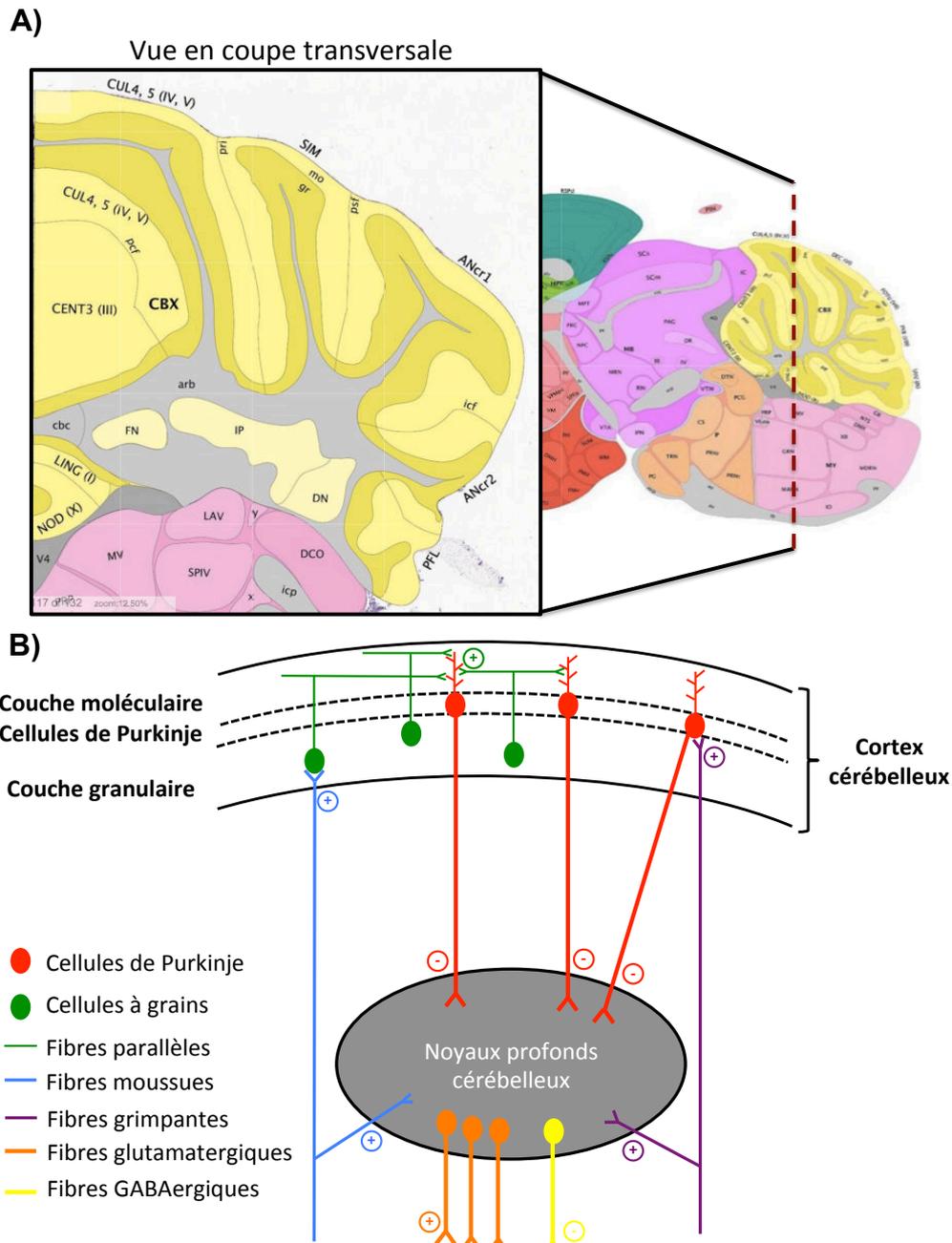


Fig 8 : Le cervelet, structure impliquée dans la régulation des fonctions locomotrices (source : « Allen brain atlas » ; <http://www.brain-map.org/>)

A) Schéma du cervelet (en jaune) avec en périphérie le cortex cérébelleux qui se compose de trois couches de cellules : la couche moléculaire (**mo**) qui est la plus externe, la couche granulaire (**gr**) qui est la plus interne et les cellules de Purkinje qui se situent entre les deux couches précédentes. En plus du cortex cérébelleux, le cervelet se compose de trois paires de noyaux profonds qui sont le noyau fastigial (**FN**), le noyau interposé (**IP**) et le noyau dentelé (**DN**). **B)** Schéma fonctionnel des principales afférences au sein du cervelet. Le (+) indique que les fibres utilisent le glutamate comme neurotransmetteur et ont donc une activité excitatrice, le (-) indique que les fibres utilisent le GABA comme neurotransmetteur et ont donc une activité inhibitrice. La majorité des fibres partant des noyaux gris centraux sont glutamatergiques avec quelques fibres GABAergiques qui partent principalement vers l'olive bulbaire, mais aussi vers l'hypothalamus.

jouer un rôle important dans la régulation du fonctionnement du striatum et pourrait donc impacter directement les fonctions motrices.

- Les CRH-R sont également présents au sein des structures impliquées dans les circuits cortico-cérébello-corticaux permettant de réguler les fonctions motrices telles que la coordination des mouvements, le tonus musculaire, la posture ou encore l'équilibre, sans pour autant être à l'origine de ces mouvements. Ces boucles fonctionnelles interviennent également dans la régulation des mouvements oculomoteurs et mandibulaires (Manto et al., 2012).

Le cervelet intervient dans la régulation de la coordination spatiale et temporelle ainsi que dans la précision du mouvement réalisé. Son rôle est donc essentiel au bon déroulement et à la précision d'un mouvement. Le cervelet reçoit des afférences de deux types : 1) les fibres grimpantes viennent exclusivement de l'olive bulbaire avec laquelle le cervelet établit des interconnexions intimes et 2) les fibres moussues dont la provenance est diverse, de la moelle épinière, des noyaux vestibulaires et trigéminaux, de la substance réticulée du tronc cérébral et pour la majorité d'entre elles des noyaux du pont, ceux-ci faisant le relais intermédiaire entre les cortex cérébraux et le cervelet. Ces afférences sont des fibres excitatrices utilisant le glutamate comme neurotransmetteur (Fig 8). Elles se projettent au niveau du cortex cérébelleux, après avoir émis des collatérales sur les noyaux profonds. Les axones des fibres grimpantes se projettent directement sur les cellules de Purkinje (corps et dendrites proximaux); les fibres moussues se projettent sur les cellules à grain de la couche granulaire du cortex. Ces dernières se projettent au niveau de la couche moléculaire par l'intermédiaire de leurs fibres parallèles, qui établissent des synapses avec les dendrites distaux des cellules de Purkinje. Les axones des cellules de Purkinje, principale voie de sortie des informations provenant du cortex cérébelleux, se projettent principalement sur les noyaux profonds (Heck et al., 2013), envoyant certaines collatérales sur les noyaux vestibulaires. Les noyaux profonds, qui constituent la principale voie de sortie du cervelet, envoient les informations, ou vers le tronc cérébral ou vers la moelle épinière, ou vers les structures supra-segmentaires du cerveau antérieur comme le cortex cérébral, l'hippocampe ou le striatum en faisant relais dans certains noyaux thalamiques ventraux (VL et VM), médians et intralaminaires (Kuramoto et al., 2011). Le thalamus fait ensuite relais au niveau du cortex frontal et préfrontal (Fig 9).

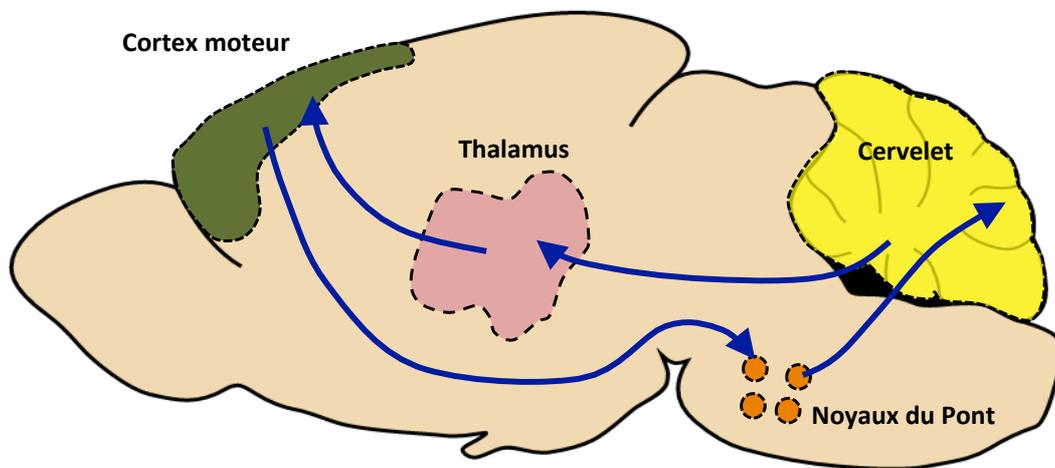


Fig 9 : Schéma de l'organisation du thalamus murin

Schéma de la boucle de régulation cérébello-thalamo-cortico-pontique. Des afférences partent du cortex moteur vers les noyaux du Pont au niveau du tronc cérébral. Ces derniers se projettent ensuite au niveau du cervelet. En réponse à ces informations, des afférences partent des noyaux profonds du cervelet vers le thalamus, qui relaie l'information vers les cortex moteur. Flèches bleues : projections glutamatergiques.

Outre son rôle dans les régulations des fonctions motrices, le cervelet est également impliqué dans la régulation des fonctions cognitives (Kim et al., 1994; Petersen et al., 1989). Des études ont révélé des interconnexions entre le cortex cérébelleux (notamment les régions Crus 1 et Crus 2) et le cortex associatif préfrontal particulièrement impliqué dans les fonctions cognitives (Bostan et al., 2013; Schmahmann and Pandya, 1997).

De plus, le cervelet pourrait également jouer un rôle dans la régulation de l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). Ceci se ferait via des connexions directes hypothalamo-cérébelleuses (du PVN de l'hypothalamus vers le cortex et/ou vers les noyaux profonds cérébelleux) et cérébello-hypothalamiques (des noyaux profonds cérébelleux vers le PVN de l'hypothalamus). Ces connexions, qui semblent être à la fois excitatrices (utilisant le glutamate) et inhibitrices (utilisant le GABA), ont été mises en évidence aussi bien chez l'Homme que chez les Rongeurs (Dietrichs, 1984; Schutter, 2012). Le cervelet est également impliqué dans la régulation de certaines fonctions végétatives telles que les fonctions cardiovasculaire, respiratoire, urinaire mais également dans la gestion des émotions grâce à ses connexions avec les différents noyaux de l'hypothalamus (Zhu et al., 2006).

Depuis la parution de la cartographie des CRH-R, établie en 2002, d'autres études ont permis de compléter ces résultats et ont notamment révélé la présence de CRH-R2 au niveau du cervelet (Bishop et al., 2000, 2006). Leur présence suggère donc une action de la CRH et des UCNs au sein de cette structure. Bien que la fonction de la CRH et de ses récepteurs ne soit pas clairement définie en condition de stress, son rôle au niveau du cervelet a été quelque peu étudié et sera détaillé ultérieurement (cf : 3.3.2).

1.4 – Les voies de signalisation activées par l'activation des CRH-R

Lorsque les récepteurs (CRH-R1 et CRH-R2) sont activés par la CRH ou les UCNs, différentes voies de signalisation pouvant être activées, ont été décrites en fonction des origines tissulaires/cellulaires étudiées (Fig 10). Certaines voies activées semblent avoir un effet protecteur pour les cellules, alors que d'autres voies semblent plutôt avoir un effet pro-apoptotique.

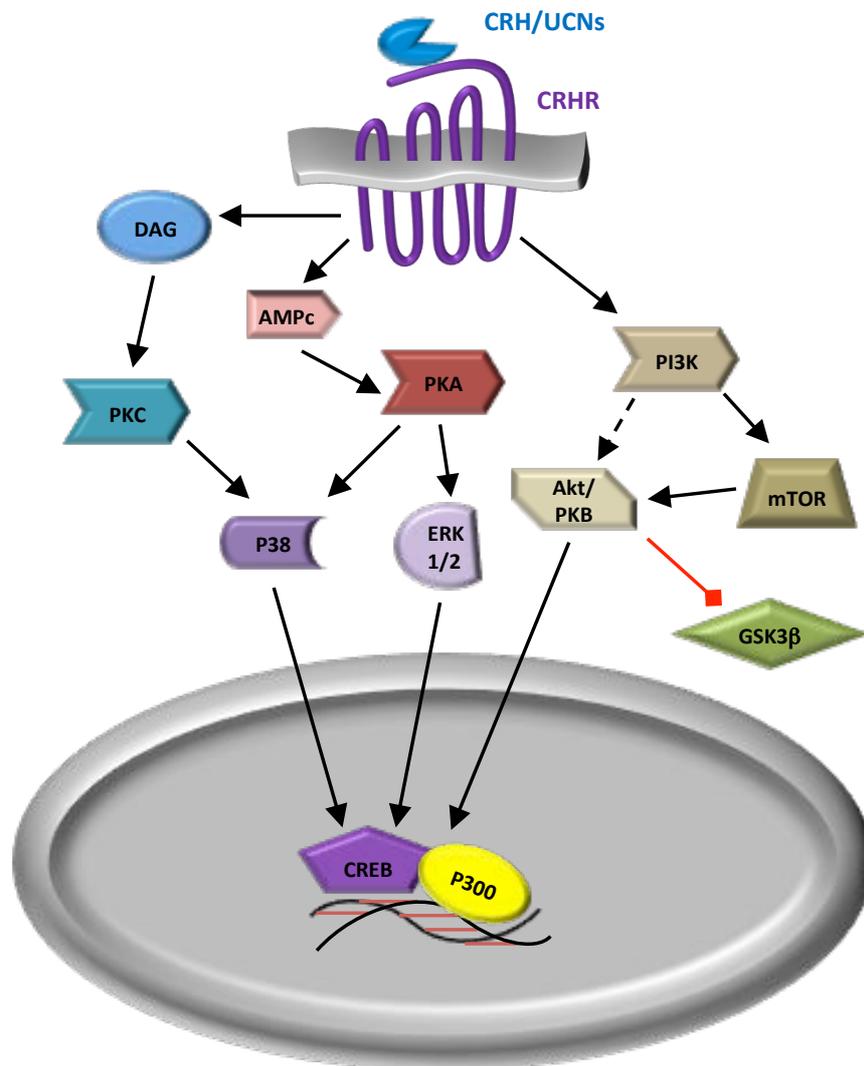


Fig 10 : Voies de signalisation activées par les CRHRs

Schéma représentant les principales voies de signalisation activées par l'activation des récepteurs à la CRH. **DAG** : diacylglycérol ; **AMPc** : adénosine mono-phosphate cyclique ; **PKA** : protéine kinase A ; **PKB** : protéine kinase B ; **PKC** : protéine kinase C ; **ERK** : kinase régulant les signaux extracellulaires ; **GSK3β** : glycogène synthase kinase 3 bêta ; **mTOR** : cible de la rapamycine chez les mammifères ; **PI3K** : phosphoinositide 3 kinase. Flèche noire : activation ; trait rouge : inhibition.

Plus précisément, des cultures primaires de neurones de rat provenant de différentes régions du cerveau (cervelet, hippocampe et cortex) stimulées avec de la CRH à 10 nM présentent une activation de CREB (élément de fixation en réponse à l'AMPC), révélée par une augmentation de son niveau de phosphorylation. Pour le cervelet et l'hippocampe, cette augmentation apparaît au bout de 15 min alors qu'elle est plus tardive avec les neurones du cortex (après 1h de stimulation). De plus, dans les cellules cérébelleuses et hippocampiques, la CRH entraîne une inactivation de GSK3 β (glycogène synthase kinase 3 bêta), par la phosphorylation de la sérine 9 dès 15 min de stimulation. Par contre, au niveau des neurones du cortex, cette protéine n'est pas retrouvée phosphorylée. La GSK3 β étant connue pour avoir des effets pro-apoptotiques, l'activation de la voie AMPc/PKA conjuguée à l'inactivation de la voie GSK3 β (par phosphorylation) indique ainsi un effet neuro-protecteur de la CRH au niveau de l'hippocampe et du cervelet, à la concentration de CRH et aux temps de cinétique utilisés lors de cette étude ([Bayatti et al., 2003](#)).

La même équipe a réalisé des études au niveau du cervelet et a montré que l'activation du CRH-R1 par la CRH entraîne l'activation de la voie AMPc/PKA qui conduit à la phosphorylation de CREB. La confirmation de l'activation de cette voie a été réalisée en étudiant le niveau d'expression du BDNF (brain-derived neurotrophic factor) celui-ci étant dépendant de l'activation de la voie AMPc/PKA. La stimulation par la CRH induit bien une augmentation de l'expression du BDNF, confirmant ainsi l'activation de la voie AMPc/PKA/CREB ([Bayatti et al., 2005](#)). Le rôle favorable du BDNF dans la neuro-plasticité, confirme un effet bénéfique de la CRH au niveau du cervelet.

Par contre, des études montrent aussi que d'autres voies sont stimulées par la CRH et que certaines semblent avoir un effet délétère pour la cellule, notamment en induisant une mort cellulaire par apoptose. L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire nécessaire dans un certain nombre de cas à la survie d'un organisme pluricellulaire. Il permet ainsi de maintenir une homéostasie cellulaire en équilibre avec le phénomène de prolifération cellulaire. Cet équilibre fragile permet la mise en place d'un renouvellement cellulaire au sein d'un tissu, sans qu'il y ait perte ou gain tissulaire. Bien que le processus apoptotique soit physiologique, il doit être finement régulé. Si ce phénomène est trop important, il y a

une rupture de l'homéostasie et cela devient délétère pour l'organisme. A l'inverse, si la prolifération est plus importante que l'apoptose, l'organisme se retrouve avec une croissance tissulaire excessive qui peut être à l'origine de certains cancers.

Parmi les études effectuées, la stimulation de cellules cancéreuses surrénales (lignée cellulaire de rat PC-12) avec de la CRH à 1 nM, entraîne l'expression du ligand de Fas (FasL) via l'activation de la voie P38/MAPK la rendant potentiellement donneuse d'apoptose ([Dermitzaki et al., 2002](#)). Une autre étude, réalisée avec une lignée de macrophage murin (RAW264.7) et des cultures primaires de macrophages murins, a montré qu'une stimulation avec de l'UCN1 ou de l'UCN2 (de 1 nM à 100 nM) induit une apoptose de ces cellules. Ces deux types cellulaires expriment à la fois du CRH-R1 et du CRH-R2, mais l'induction d'apoptose ne semble se faire que par l'activation du CRH-R2. En effet, l'utilisation d'un antagoniste du CRH-R1 n'inhibe pas l'induction de cette mortalité cellulaire, contrairement à l'action de l'anti-sauvagine 30 qui est un antagoniste spécifique du CRH-R2. Pour comprendre quels signaux cellulaires sont activés et conduisent à cette mortalité cellulaire, des études plus approfondies ont été réalisées sur la lignée de macrophage RAW264.7. L'activation du CRH-R2 ne semble pas activer les voies p38/MAPK, ni les voies JNK (c-Jun NH2-terminal Kinase) connues habituellement pour jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose lors d'un stress. Par contre, il y a une activation des signaux pro-apoptotiques Bad (Bcl2-associated death promoter) et Bax (Bcl2-associated X protein), ([Tsatsanis et al., 2005](#)).

L'ensemble de ces études étant réalisé sur une lignée cellulaire, il se peut que les voies de signalisation activées diffèrent un peu des voies utilisées par des cellules non immortalisées.

2 – La CRH et les glucocorticoïdes : deux régulateurs majeurs de la réponse au stress

2.1 – Importance du stress dans la société

Dans notre société, le stress impacte en général fortement notre quotidien que ce soit au niveau professionnel ou personnel. Des études réalisées par « l'agence européenne pour la sécurité et la santé au travail » révèlent que pour près de 50%

des travailleurs européens, le stress est présent au quotidien dans leur travail et qu'il est à l'origine de près de la moitié des jours non travaillés¹.

D'un point de vue économique, le coût mondial de la prise en charge du stress et des jours non travaillés se chiffre en milliards d'euros. Ce coût a été évalué à 20 milliards d'euros en 2002 en Europe et entre 2 et 3 milliards d'euros en 2007 en France selon une étude de l'INRS (Institut National de la Recherche et de la Sécurité)².

Une meilleure compréhension ainsi qu'une meilleure prise en charge du stress sont donc un enjeu socio-économique majeur, que ce soit dans le domaine de la santé publique ou dans le domaine professionnel.

L'étude des mécanismes de réponse au stress est donc primordiale car elle permet ainsi d'envisager des traitements plus ciblés permettant une meilleure prise en charge plus rapide et plus efficace.

2.2 – Généralités sur le stress

Dans le langage courant, le mot « stress » est souvent utilisé de façon abusive pour parler à la fois des facteurs de stress (les causes), et de la réponse au stress (la conséquence). Cette notion de stress est effectivement très difficile à définir car il n'existe pas qu'un seul type de facteur de stress. Afin d'améliorer la compréhension de cette notion, plusieurs définitions ont pu être proposées.

Parmi ces définitions, une a l'avantage de regrouper à la fois les notions de « facteurs de stress » et de « réponse au stress » :

« Un stress peut être défini comme toutes conditions, comprenant un environnement, une expérience défavorable ou encore une menace perçue, qui peuvent altérer l'homéostasie d'un organisme et qui nécessitent une réponse physiologique » (Maniam et al., 2014).

¹ Agence européenne de la sécurité et de la santé : <https://osha.europa.eu/fr/themes/psychosocial-risks-and-stress>

² Institut national de la recherche et de la santé (INRS) : <http://www.inrs.fr/risques/stress/consequences-entreprise.html>

Toutefois, cette définition reste très généraliste et ne prend pas en compte les différents types de facteurs de stress qu'un organisme peut rencontrer. Parmi ces différents types de stress, deux grandes catégories se distinguent : les stress dits « aigus » et les stress dits « chroniques ». D'un point de vue général, la distinction entre ces 2 grands types de stress s'inscrit dans le temps. Un stress va être considéré comme étant « aigu » s'il est de courte durée, alors qu'il sera considéré comme « chronique » s'il dure dans le temps.

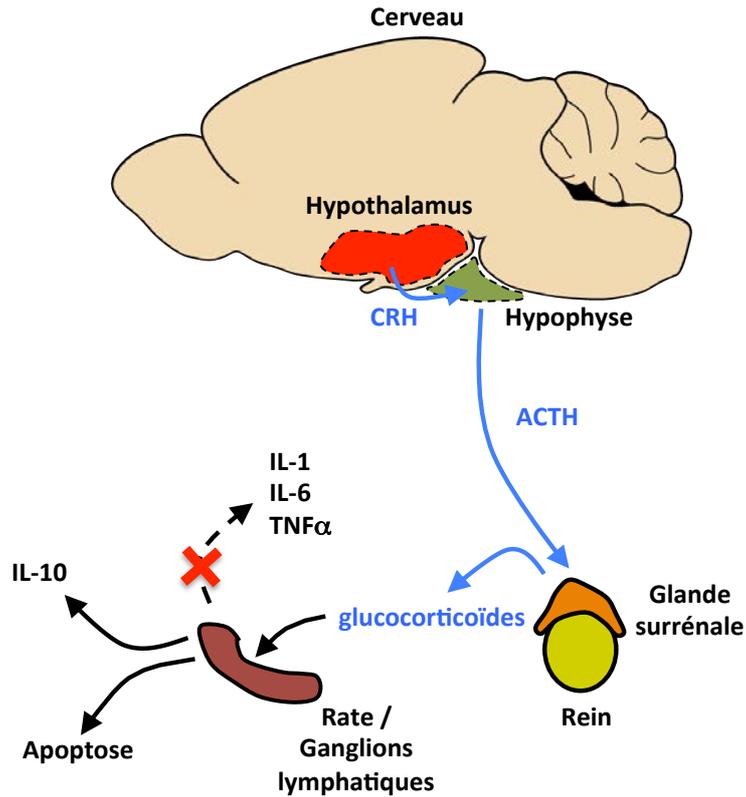
Mais encore une fois, la distinction entre ces 2 types de stress n'est pas toujours très claire. En effet, quelle est la limite de temps pour qu'un stress soit considéré comme « aigu » ou « chronique » ?

Le Pr. Dhabhar FS., qui a travaillé sur cette thématique, propose la séparation suivante : un stress est considéré comme « aigu » s'il dure de quelques minutes à quelques heures, alors qu'il est considéré comme « chronique » s'il perdure quelques heures par jour sur plusieurs jours ou mois ([Dhabhar, 2014](#); [Dhabhar and McEwen, 1997](#)).

Une chose est sûre, d'un point de vue physiologique, une réponse au stress se caractérise par 3 grandes phases ([Ganzel et al., 2010](#); [Girdler and Klatzkin, 2007](#)):

- **La phase d'alarme** : elle correspond à la 1^{ère} phase du processus de la réponse à un stress face à une situation oppressante. C'est au cours de cette phase que les premiers signes cliniques apparaissent (respiration rapide, accélération du rythme cardiaque et augmentation de la pression artérielle). Cette phase, qui est la mieux caractérisée, correspond à l'étape de forte augmentation de production de CRH.
- **La phase de résistance** : elle correspond à la 2^{ème} phase de la réponse au stress. Cette phase survient lorsqu'une situation stressante persiste. Une résistance permet alors de faire face à cette situation afin de s'adapter. Lors de cette étape, des mécanismes tels que l'augmentation du taux de glycémie vont se mettre en place afin de compenser les dépenses énergétiques utilisées pour la mise en place d'une réponse adaptée à la situation.
- **La phase d'épuisement** : elle correspond à la 3^{ème} phase de la réponse au stress. Cette phase se met en place lorsque la situation stressante

A)



B)

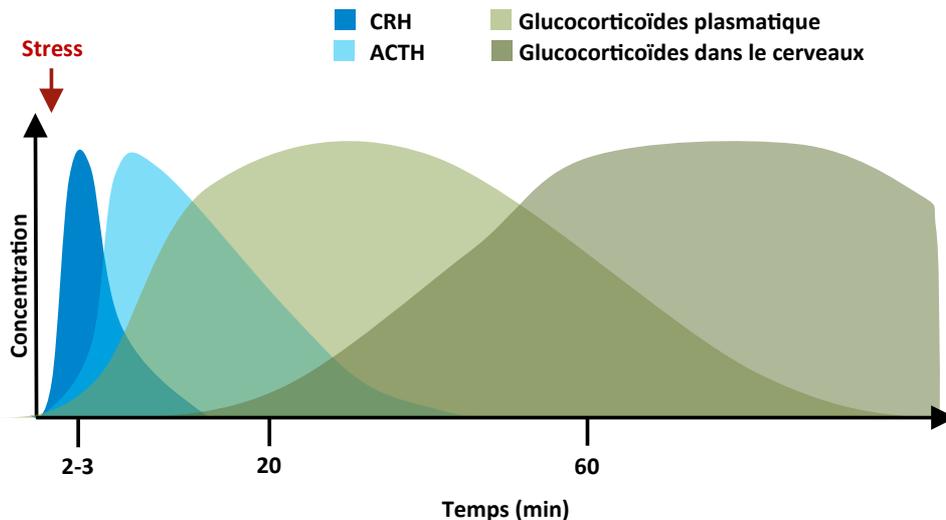


Fig 11 : Activation de l'axe HHS et cinétique de production des molécules impliquées dans la réponse au stress

A) Organisation de la mise en place de la réponse physiologique lors d'une exposition à un stress par l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS). Les glucocorticoïdes produits par les glandes surrénales vont ensuite agir, entre autres, au niveau du SI en inhibant la production de certaines cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF α), en induisant l'apoptose des cellules produisant les cytokines pro-inflammatoires et en induisant l'expression d'autres cytokines comme l'IL-10. **B)** Cinétique de production des différentes hormones impliquées dans l'axe HHS lors de la mise en place d'une réponse au stress. Figure adaptée de l'article de Bains et al., 2015.

persiste trop dans le temps. L'épuisement total de l'organisme ne lui permet plus de faire face à la situation. C'est au cours ou à la suite de cette phase que certaines pathologies peuvent apparaître telles que la dépression ou encore certaines maladies auto-immunes (Iseme et al., 2014).

2.3 – Mise en place de la réponse au stress

Lors d'un stress, l'activation de l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien (HHS) permet de répondre aux stimulations perçues par l'organisme comme étant stressantes, afin de s'adapter à son environnement.

Cette activation se traduit par une forte augmentation de la production de CRH au niveau du PVN de l'hypothalamus. La CRH va alors agir au niveau de l'hypophyse, une glande endocrine située juste en dessous de l'hypothalamus, avec lequel elle est reliée par la tige pituitaire. Cette stimulation par la CRH entraîne une augmentation de l'expression du gène de la pro-opiomélanocortine (POMC). La POMC est ensuite clivée, entraînant la formation de l'hormone hypophysaire adrénocorticotrope (ACTH). L'ACTH, après son passage dans la circulation systémique, va stimuler les cellules corticotropes des glandes surrénales et entraîner une forte augmentation de la production de glucocorticoïdes comme la corticostérone chez le Rongeur ou son homologue, le cortisol chez l'Homme (Fig 11 ; Bains et al., 2015).

Ces glucocorticoïdes sont capables de réguler l'axe HHS par des phénomènes de rétro-contrôle négatif sur l'hypothalamus et l'hypophyse. Ils sont également susceptibles d'agir positivement ou négativement, lorsqu'ils sont en quantité trop importante, sur l'ensemble du SNC mais également en périphérie notamment au niveau des systèmes cardiaque, vasculaire, respiratoire ou encore immunitaire.

Le stress permet donc la mise en place d'une réponse physiologique lors d'événements ressentis comme stressants par l'organisme. Cette réponse s'arrête lorsque l'organisme n'est plus soumis à ces facteurs de stress. Il y a donc une adaptation qui se fait en fonction de l'environnement de l'organisme. Par contre, lorsque le stress est trop important ou qu'il perdure dans le temps, l'organisme stressé anticipe avec inquiétude une éventuelle exposition à de nouveaux facteurs

de stress, sans pour autant y être exposé au moment en question, ni forcément par la suite. Il n'y a alors plus d'adaptation et cet état de stress devient délétère, on parle alors de dépression.

A ce jour, aucun lien de cause à effet n'a pu être clairement établi entre le taux de CRH et la survenue d'une dépression. Une étude, réalisée par l'équipe de Nemeroff et al, a montré que sur 23 patients dépressifs, 11 d'entre eux présentaient un taux de CRH anormalement élevé dans le liquide céphalo-rachidien (LCR), indiquant donc que les boucles de rétro-contrôle ne sont plus efficaces ([Nemeroff et al., 1984](#)). Suite à ces études, et vu le rôle de la CRH dans la réponse au stress, cette hormone est devenue une cible thérapeutique potentielle.

Pour cette raison, différents antagonistes de la CRH ont été développés comme traitements antidépresseurs. Malheureusement, parmi les différents antagonistes de la CRH testés, aucun n'a pour l'instant d'action rivalisant avec les antidépresseurs actuels ([Jutkiewicz et al., 2005](#)).

Malgré tout, l'antalarmine, un antagoniste spécifique du CRH-R1 a suscité un intérêt particulier. En effet, différentes études ont révélé que son injection entraîne une action anxiolytique ainsi qu'une baisse de l'inflammation dans certaines maladies inflammatoires telles que l'arthrite, le syndrome du côlon irritable ou encore dans certains cas d'ulcères intestinaux ([Gabry et al., 2002](#); [Greenwood-Van Meerveld et al., 2005](#); [Webster et al., 2002](#)).

Des tests réalisés *in vitro* sur des cellules de moelle osseuse de rat, de chien et humaine, ainsi que des études *in vivo* réalisées sur le rat, le chien et le singe ont révélé une légère toxicité de l'antalarmine à très fortes doses (de 30 à 300 mg/kg) associée à une augmentation de la masse du foie et des reins (dès 30 mg/kg), de la masse splénique et d'une baisse de la masse thymique (uniquement pour la dose à 300 mg/kg). Ces altérations s'accompagnent d'une baisse du taux d'hématocrite et de la teneur en hémoglobine. Cependant, le dosage à 30 mg/kg n'entraînant qu'une faible augmentation de la masse du foie après 90 jours d'exposition et une légère baisse de l'hématocrite après 13 semaines d'exposition, il ne semble pas y avoir de toxicité à des doses plus faibles. Ainsi, il semble que la marge de sécurité soit suffisante pour envisager un éventuel passage en phase clinique avec des dosages plus faibles ([Horn et al., 2008](#)). Toutefois, à ce jour, aucun essai clinique ne semble avoir été réalisé avec cette molécule.

2.4 – Action de la corticostérone en cas de stress

Les glucocorticoïdes agissent via des récepteurs nucléaires (récepteurs aux glucocorticoïdes, GR) codés par le gène *nr3c1*. Comme pour la majorité des récepteurs nucléaires, ces récepteurs sont principalement situés au niveau du cytoplasme lorsqu'ils sont inactifs. Une fois activés par les glucocorticoïdes, les GR forment des dimères, passent dans le noyau et se fixent sur l'ADN au niveau d'éléments de réponse aux GR (GRE) favorisant, ou au contraire inhibant la transcription de gènes cibles. Ce mode d'action, classique pour les récepteurs nucléaires, est dit « génomique » car les GR interagissent alors directement avec le génome. Toutefois, les GR peuvent également avoir un deuxième mode d'action, moins bien connu. En effet, les GR inactifs peuvent être pris en charge par un complexe comportant notamment des intégrines leur permettant de s'ancrer à la membrane cytoplasmique. Dans ce cas, les récepteurs sont donc membranaires. Le couplage activerait les intégrines qui seraient à l'origine de voie(s) de signalisation. Avec ce mode d'action dit « non-génomique », les GR ne passent donc pas dans le noyau et n'interagissent pas directement avec l'ADN. Ce sont les acteurs des voies de signalisation activées qui permettront l'expression de gènes cibles. A priori, l'activation de cette voie « non-génomique » serait plus rapide que l'activation de la voie « génomique » ; toutefois à ce jour, peu de données sont disponibles sur cette voie d'activation des GR et leur rôle physiologique ([Ayroldi et al., 2012](#); [Nicolaidis et al., 2015](#)).

En plus de leur fixation sur les GR, les glucocorticoïdes peuvent aussi se fixer sur les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR), également des récepteurs de type nucléaires et codés par le gène *nr3c2*. Bien que les glucocorticoïdes aient une bonne affinité pour ces récepteurs, ces derniers sont absents ou peu présents au niveau du SI et du cervelet. C'est pourquoi l'action des glucocorticoïdes via les MR n'a pas été traitée dans le cadre de ce projet.

Jusqu'aux années 1990, les glucocorticoïdes étaient considérés comme les principaux effecteurs, voire les seuls effecteurs, de la réponse au stress. C'est pourquoi, la plupart des travaux concernent l'impact d'une augmentation de la production de glucocorticoïdes lors d'une réponse à un stress.

En plus de son action au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse dans la régulation de l'axe HHS (Slominski, 2007; Weiser et al., 2011), des études ont montré qu'une exposition à un stress ou à des injections de corticostérone (5 mg/kg) durant la puberté entraînait une augmentation de l'agressivité à l'âge adulte. Ces troubles observés mettent en avant une augmentation de la probabilité de développer des troubles psycho-sociaux chez les jeunes subissant des stress trop intenses au cours de leur développement, notamment lors de l'adolescence (Cordero et al., 2012; Márquez et al., 2013; Veenit et al., 2013). D'après des études réalisées sur des rats, la corticostérone entraîne également une altération des fonctions cognitives. Ces altérations peuvent se traduire par un déficit au niveau de l'apprentissage spatial et de la mémorisation, évalués par différents tests comportementaux tels que le labyrinthe aquatique de Morris, un test de reconnaissance d'un nouvel objet ou encore un test contextuel de peur conditionnée (Darcet et al., 2014; Wüppen et al., 2010). Outre ces effets sur le comportement, il s'avère qu'une exposition à la corticostérone entraîne une baisse globale de l'activité métabolique comme cela a été évalué sur des cerveaux de rat (Bennett et al., 1996). Cette activité est évaluée grâce à l'activité de la cytochrome oxydase (COX), dernière enzyme mitochondriale de la chaîne respiratoire permettant ainsi la production d'énergie au niveau cellulaire. L'activité de cette enzyme est considérée comme étant un bon marqueur de l'activité métabolique neuronale (Wong-Riley, 1989).

En plus de son action sur l'apprentissage et la mémorisation, la corticostérone peut également altérer les capacités motrices. Des études réalisées sur des souriceaux de 7 jours ayant reçu de la dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse) montrent une diminution de leurs performances dans le test du rotarod (test de coordination motrice). Cette altération s'accompagne d'une induction d'apoptose au niveau des cellules de Purkinje du cortex cérébelleux (Maloney et al., 2011).

Un excès de glucocorticoïdes, lors d'un stress, semble donc pouvoir altérer les fonctions cognitives et motrices au niveau du SNC.

Au delà de l'impact sur le SNC, les glucocorticoïdes ont également un effet sur différents systèmes périphériques. Parmi les organes cibles des glucocorticoïdes, ceux du SI sont particulièrement sensibles à leurs actions. Ces glucocorticoïdes vont exercer une action anti-inflammatoire via leurs GR, permettant ainsi de réguler

l'excès de réaction inflammatoire qui peut survenir lors d'une infection ou dans le cadre de certaines pathologies ([Busillo and Cidlowski, 2013](#); [Cruz-Topete and Cidlowski, 2015](#)).

L'inflammation est un processus biologique utile et nécessaire qui se met en place lors d'un stress cellulaire, comme une infection ou une brûlure ou encore une d'allergie. Ce processus se traduit par une forte augmentation de l'expression de certaines cytokines chimioattractantes (qui vont permettre le guidage des cellules immunitaires vers le site de stress) et de cytokines pro-inflammatoires qui, en créant une vasodilatation locale des vaisseaux sanguins, vont permettre la diapédèse des cellules recrutées. Ce processus permet donc de répondre efficacement aux stress cellulaires. Parmi les cytokines pro-inflammatoires exprimées le plus précocement se trouvent l'interleukine 1 β (IL-1 β), l'IL-6 et le facteur de nécrose tumoral (tumor necrosis factor alpha, TNF α).

Bien que cette réaction inflammatoire soit utile et nécessaire, elle ne doit pas s'emballer pour éviter qu'elle ne devienne mauvaise pour l'organisme. C'est visiblement ce processus délétère qui survient dans certaines pathologies où une inflammation chronique perturbe l'homéostasie (e.g, l'arthrite, la maladie de Crohn ou encore les rectocolites hémorragiques). Contrôler cette inflammation est donc capital pour l'intégrité et le bon fonctionnement de l'organisme.

Les glucocorticoïdes jouent un rôle essentiel dans la régulation de la réaction inflammatoire. Cette régulation peut se faire via différents mécanismes qui peuvent s'observer aussi bien au niveau de la rate, du thymus, des ganglions lymphatiques qu'au niveau de la circulation sanguine ([Baschant and Tuckermann, 2010](#)). Elle consiste principalement à :

- Inhiber l'expression des cytokines pro-inflammatoires (e.g, IL-1, IL-6 et TNF α).
Il est à noter que les cellules produisant ce type de cytokines s'auto régulent elles-mêmes en produisant plus tardivement des récepteurs solubles à ces cytokines. Cela permet ainsi de limiter la liaison des cytokines à leurs récepteurs membranaires et donc de diminuer l'activité des cellules cibles.
- Induire l'apoptose de cellules produisant ces cytokines pro-inflammatoires, notamment des neutrophiles, macrophages et lymphocytes T (L_T).

- Favoriser l'expression de cytokines pouvant avoir une action anti-inflammatoire comme l'IL-10 produite notamment par les neutrophiles, monocytes et macrophages mais qui a également une activité mitogène pour les lymphocytes B (L_B).

Toutefois, les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes sont à modérer car des études récentes montrent qu'ils peuvent avoir une action pro-inflammatoire dans certains cas. En effet, si une exposition aiguë à la corticostérone peut favoriser la mise en place d'une réponse immunitaire, une exposition chronique peut au contraire entraîner une immunosuppression ([Cruz-Topete and Cidlowski, 2015](#)). Les mécanismes permettant à une même hormone d'avoir deux effets opposés sont encore mal connus. Pourtant, malgré leur action anti-inflammatoire, les glucocorticoïdes peuvent également induire l'expression de certains « Toll-like récepteurs » (TLR), notamment les TLR2 et TLR4. Or l'activation de ces TLR induit l'expression de marqueurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 β , l'IL-6 ou encore le TNF α . D'autres récepteurs, dont l'activation peut induire l'expression de marqueurs pro-inflammatoires, sont sous contrôle des GR. Parmi ceux-ci, l'expression de NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3) par les cellules du système immunitaire inné (ex : monocyte/macrophage) ou encore de P2Y2R (récepteur purinergique) par les cellules endothéliales, peut être induit par les glucocorticoïdes. Lorsque ces récepteurs sont activés, ils peuvent entraîner l'expression de certains marqueurs pro-inflammatoires tels que l'IL1 β et l'IL-6 ([Busillo et al., 2011](#); [Ding et al., 2010](#)). Ainsi, les glucocorticoïdes peuvent donc avoir une action pro-inflammatoire indirecte via les régulations qu'ils exercent sur l'expression de certains gènes cibles.

De par leurs actions importantes sur l'organisme, la production de glucocorticoïdes est finement régulée. Ils peuvent en fait être présents sous deux formes : une forme active, la corticostérone chez les Rongeurs et le cortisol chez l'Homme et une forme inactive, la 11-déhydrocorticostérone chez les Rongeurs et la cortisone chez l'Homme. Pour avoir une action biologique, ils doivent être dans leur conformation active. C'est le rôle de deux enzymes, les 11 bêta hydroxystéroïde déshydrogénase de type 1 et de type 2 (respectivement 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2),



Fig 12 : Les 11 beta-hydroxystéroïde déshydrogénases (11β-HSD)

Rôle des 11β-HSD dans la régulation de l'activité de la corticostérone. La 11β-HSD1 catalyse essentiellement la forme inactive (11-déhydrocorticostérone) pour donner la forme active de la corticostérone. A l'inverse, la 11β-HSD2 va inactiver la corticostérone afin de donner de la 11-déhydrocorticostérone.

que de convertir la forme active en une forme inactive et inversement (Fig 12). Plus précisément,

- **La 11 β -HSD1** est capable de catalyser la forme inactive du glucocorticoïde en forme active grâce à son activité réductase. Cette enzyme est donc capable de potentialiser les effets de la corticostérone en la réactivant. Toutefois, la 11 β -HSD1 possède également une activité déshydrogénase capable de catalyser la forme active en forme inactive. Malgré tout, cette activité déshydrogénase est largement minoritaire et cette enzyme agit donc essentiellement comme une réductase.
- **La 11 β -HSD2**, quant à elle, possède une activité déshydrogénase capable de catalyser la forme active en forme inactive. Cette enzyme régule donc l'activité de la corticostérone en limitant sa forme active.

L'activité de ces deux enzymes est donc primordiale pour réguler l'action des glucocorticoïdes au sein des cellules/tissus et réguler l'activation de l'axe HHS.

La présence de la 11 β -HSD1 dans les régions du cerveau intervenant dans les boucles de rétrocontrôle négatif de l'axe HHS comme l'hippocampe, l'hypothalamus et l'hypophyse suggère un rôle-clé de cette enzyme dans la régulation de l'axe HHS et donc dans l'activité des glucocorticoïdes. La perte d'expression de la 11 β -HSD1 chez des souris invalidées pour ce gène, entraîne une altération des boucles de rétrocontrôle négatif de l'axe HHS, conduisant à une réponse exagérée lors d'une exposition à un stress et à une hyperplasie des glandes surrénales. En fonction des lignées de souris étudiées, la perte d'expression de la 11 β -HSD1 peut également entraîner une augmentation du taux de corticostérone sérique (notamment pour la lignée de souris 129/MF1) ou au contraire garder un niveau basal de corticostérone sérique (notamment pour la lignée de souris C57Bl/6), (Carter et al., 2009; Harris et al., 2001). Cette enzyme est donc cruciale dans la régulation de l'axe HHS et son action peut varier en fonction du fond génétique de l'espèce étudiée. En plus de son rôle dans la régulation de l'axe HHS, la présence de la 11 β -HSD1 au niveau de l'hippocampe suggère que cette enzyme pourrait jouer un rôle dans la régulation des fonctions cognitives. Des études

réalisées sur des souris n'exprimant pas la 11 β -HSD1 montrent une amélioration des capacités d'apprentissage et de mémorisation, notamment chez les souris âgées (Yau et al., 2001, 2007). De plus, la présence de la 11 β -HSD1 au niveau du cervelet suggère que cette enzyme pourrait également jouer un rôle dans la régulation des capacités de coordination locomotrice car sa déplétion provoque une augmentation de l'activité d'exploration des souris, associée à une augmentation des capacités motrices (Wyrwoll et al., 2011).

La 11 β -HSD2, quant à elle, protège les tissus de l'excès de corticostérone qui pourrait être délétère, en l'inactivant. L'activité de cette enzyme a été principalement étudiée lors du développement. Chez le rat, la 11 β -HSD2 semble jouer un rôle important dans la protection des cellules mitotiques immatures du SNC foetal qui peuvent être exposées aux glucocorticoïdes maternels. Cette enzyme, semble donc avoir un rôle neuro-protecteur lors du développement du SNC, non seulement pendant la période foetale, mais aussi dans le développement post-natal (Wyrwoll et al., 2011). En effet, elle est fortement exprimée après la naissance, notamment au niveau des cellules granulaires du cortex cérébelleux et dans certains noyaux thalamiques (Robson et al., 1998). Chez les souris invalidées pour le gène codant la 11 β -HSD2, une perte des couches granulaires interne et moléculaire du cortex cérébelleux est observée lors du développement, entraînant la formation d'un cervelet plus petit que la normale (Holmes et al., 2006).

Ces deux enzymes ne sont pas présentes uniquement dans le SNC. Elles se retrouvent dans l'ensemble de l'organisme permettant ainsi de réguler localement l'action des glucocorticoïdes au sein des tissus.

3 – Rôle du système CRH/CRH-R1 au niveau du SNC

En condition de stress, les glucocorticoïdes vont agir sur le SNC afin de réguler l'activité des différentes structures le composant (cf : I.2.4) mais ils ne sont pas les seuls effecteurs lors de cette réponse au stress. En effet, la CRH joue également un rôle important dans ces régulations et la présence abondante de ses récepteurs (CRH-R) au sein du SNC indique qu'elle peut avoir une action directe sur les différentes structures du SNC, en plus de son action connue sur l'hypophyse.

Dans le cadre de ce projet de thèse, l'analyse de l'impact de la CRH va se focaliser principalement sur deux structures du SNC jouant un rôle important dans les fonctions cognitives et motrices : l'hippocampe et le cervelet.

3.1 – Impact de la CRH au niveau de l'hippocampe

Le stress peut entraîner une altération des fonctions cognitives, notamment au niveau des fonctions d'apprentissage et de mémorisation. Ces effets peuvent être dûs à l'action des glucocorticoïdes (cf : 1.2.4) mais la CRH peut elle aussi jouer un rôle important à ce niveau.

Chez la souris, la CRH est utile à la maturation post-natale de l'hippocampe. Elle participe notamment à l'organisation synaptique de la région en limitant la formation de synapses et le nombre d'épines dendritiques. Des études réalisées sur des souris invalidées pour le gène codant le CRH-R1 ($CRH_1^{-/-}$) montrent une organisation anormale des épines dendritiques. Les neurones de l'hippocampe possèdent plus de dendrites, de taille plus importante. Le même phénomène a été observé sur des cultures primaires de cellules d'hippocampe de rat cultivées avec un antagoniste spécifique du CRH-R1 (Chen et al., 2004a; Ivy et al., 2010). Donc la CRH joue un rôle important dans le modelage architectural de l'hippocampe, nécessaire à son bon fonctionnement.

Chez le rat adulte, l'équipe de Chen a également montré qu'il y avait une production endogène de CRH au niveau des cellules GABAergiques de la couche pyramidale de l'hippocampe (Chen et al., 2004b).

Le rôle physiologique de la CRH au niveau de l'hippocampe est dose-dépendant :

- A faible dose (dose physiologique au repos) ou lors d'un léger stress (de l'ordre de quelques minutes), de brèves stimulations de CRH permettent d'améliorer les capacités de mémorisation en augmentant la potentialisation à long terme (PLT) synaptique. Ce phénomène a été mis en évidence aussi bien chez la souris que chez le rat et semble passer par l'activation du CRH-R1 (Blank et al., 2002; Chen et al., 2012a). Le phénomène de PLT a été découvert au niveau de l'hippocampe dans un premier temps puis dans d'autres structures du SNC par la suite. Ce phénomène permet de stabiliser et de renforcer la formation synaptique et de diminuer le seuil d'activation du neurone post-synaptique. Le rôle de la PLT a été très étudié au

niveau de l'hippocampe, notamment pour son implication dans le processus d'apprentissage et de mémorisation (De Roo et al., 2008; Jedlicka et al., 2008).

- A forte dose, comme par exemple lors d'un stress intense ou chronique, la CRH a plutôt un effet délétère sur l'hippocampe. Cet excès de CRH semble altérer l'arborisation dendritique des neurones hippocampiques, au détriment du processus de PLT qui diminue, entraînant une altération des capacités de mémorisation (Chen et al., 2012a). De plus, des études réalisées sur des cultures primaires de neurones provenant d'hippocampe de rat, stimulées avec différentes concentrations de CRH, ont montré une induction d'apoptose croissante en fonction des doses de CRH (de 10^{-9} M à 10^{-5} M), qui est inhibée par l'administration combinée d'un antagoniste de la CRH spécifique du CRH-R1 (le CP-145526), (Zhang et al., 2012).

Ces études montrent donc bien qu'un excès de CRH peut avoir un effet délétère au niveau de l'hippocampe et que cet effet passe par l'activation du CRH-R1.

Une étude récente montre qu'une stimulation *in vitro* de coupe d'encéphale de rat avec de la CRH, ainsi que de l'UCN1 (contrairement aux UCN2 et 3) inhibe la libération de glutamate au niveau de l'hippocampe et favorise celle de GABA au niveau de l'amygdale (Bagosi et al., 2008). Cette action est réversée avec de l'antalarmine et passerait donc uniquement par l'activation du CRH-R1 et pas par le CRH-R2 (Bagosi et al., 2015). Ces résultats mettent en évidence une activation indirecte de l'axe HHS par l'intermédiaire du noyau BST, dont les neurones GABAergiques inhibiteurs se projettent sur l'hypothalamus. Or, le BST reçoit des afférences glutamatergiques de l'hippocampe et des afférences GABAergiques de l'amygdale. En diminuant la libération de glutamate au niveau de l'hippocampe et en augmentant la production de GABA au niveau de l'amygdale, les neurones du BST sont donc inhibés. Ceci permet alors de lever leur activité inhibitrice sur l'activation de l'axe HHS (Smith and Vale, 2006).

3.2 – Impact de la CRH au niveau du cervelet

Bien que les récepteurs à la CRH (CRH-R1 et CRH-R2) soient exprimés au niveau du cortex et des noyaux profonds du cervelet, peu de choses sont connues sur le rôle de la CRH au sein de cette structure.

Des études réalisées sur des souris transgéniques surexprimant la CRH (CRH-OE) ont montré une atrophie globale du cerveau accompagnée d'une diminution de la masse du cervelet. Ces modifications morphologiques se traduisent par une altération des fonctions motrices observées dans différents tests de comportement (Goebel et al., 2010). Dans ce modèle murin, la surexpression de CRH s'accompagne d'une augmentation de la production de glucocorticoïdes. Il est donc difficile de savoir si les effets observés sont liés à une action directe de la CRH ou indirecte via les glucocorticoïdes, (voire aux deux actions cumulées).

Il a également été montré que la CRH pouvait jouer un rôle important dans l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje (PC) au niveau du cervelet. En effet, des études menées sur des cultures de coupe de cervelet provenant de jeunes rats âgés de 8 jours, ont montré que des expositions quotidiennes de CRH à 1 nM pendant 12h sur des durées de 4 et 10 jours favorisaient le développement de l'arborescence des épines dendritiques des PC. Elle se traduit par une augmentation de la taille des dendrites et du nombre d'embranchements. En revanche, une exposition continue de CRH à 1 nM pendant 10 jours aurait un effet inverse avec une diminution de l'arborescence dendritique des PC, associée à une baisse de la taille des dendrites et de leurs embranchements (Gounko et al., 2013; Swinny et al., 2004).

En plus de son rôle dans le modelage architectural, la CRH aurait également un autre rôle dans le cervelet. Des études chez le rat ont en effet montré que l'hormone interviendrait dans le processus de dépression à long terme (DLT), (Ito, 2009; Miyata et al., 1999; Ohtsuki et al., 2009). Ce processus de DLT, opposé au PLT observé dans l'hippocampe, se caractérise par un affaiblissement des connexions synaptiques conduisant à la déconnexion de la synapse. Ce phénomène jouerait un rôle important dans la plasticité synaptique nécessaire à l'apprentissage des compétences locomotrices. Il serait à l'origine d'un remodelage synaptique au niveau du cervelet qui permettrait la correction d'un mouvement mal exécuté (Hirano, 2013; Ito, 2001). Toutefois, des études d'inhibition de DLT, réalisées sur des souris, ont montré un apprentissage locomoteur normal prouvant qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans cet apprentissage locomoteur (Hirano et al., 2015).

En plus de son rôle dans le modelage architectural des épines dendritiques des PC et son impact sur les connexions synaptiques, la CRH semble jouer un rôle physiologique dans les fonctions locomotrices. Des études réalisées sur des souris

transgéniques surexprimant la CRH montrent une diminution globale de l'activité motrice ([van Gaalen et al., 2002](#)) bien que dans ce modèle, ces altérations ne puissent pas être directement imputées à la CRH. En effet, la surproduction de CRH entraînant une augmentation de production de glucocorticoïdes et il est possible que ces derniers aient un impact direct sur les fonctions locomotrices.

3.3 – Controverse sur l'action de la CRH au niveau du SNC

De nombreuses études montrent donc que la CRH peut exercer un effet délétère, notamment au niveau de l'hippocampe et du cervelet (cf : I.3.1 et I.3.2). Les résultats de ces études sont en corrélation avec d'autres études montrant un effet pro-apoptotique de la CRH sur la microglie ([Ock et al., 2006](#)).

Toutefois, une controverse existe sur l'effet délétère de la CRH au niveau du SNC et il semble que son action au niveau du SNC ne soit pas aussi simple que décrit précédemment. En effet, en regardant la littérature, notamment sur le rôle que peut jouer la CRH sur l'hippocampe, certains articles tendent à montrer que la CRH, à des concentrations de 1 à 10 nM, pourrait avoir un effet protecteur sur les neurones (cf : I.1.4).

En regardant l'ensemble de la littérature sur les effets de la CRH sur les différents systèmes biologiques étudiés, un paramètre important se dégage. Les effets de cette hormone sont en effet dose-dépendants, ce qui se comprend relativement bien vu son rôle dans la réponse au stress. Les effets à faibles doses (taux basal physiologique) sont différents des effets à fortes doses (augmentation pouvant mimer un état de stress). Malgré cela, des effets protecteurs ou au contraire, délétères peuvent être trouvés pour des mêmes concentrations de CRH, ce qui peut paraître contradictoire.

Un deuxième paramètre permet de justifier les différents effets qui peuvent être observés : il s'agit du temps d'exposition à la CRH. En effet, en reprenant l'étude réalisée par l'équipe de Swinny et al en 2004 (cf : I.3.2 ; [Swinny et al., 2004](#)), il apparaît que pour les mêmes concentrations de CRH utilisées, les effets observés ne sont pas les mêmes en fonction du temps d'exposition à l'hormone. Il apparaît donc clairement qu'en plus d'avoir un effet dose-dépendant, l'action de la CRH est également temps-dépendant. Un troisième paramètre à prendre vraisemblablement

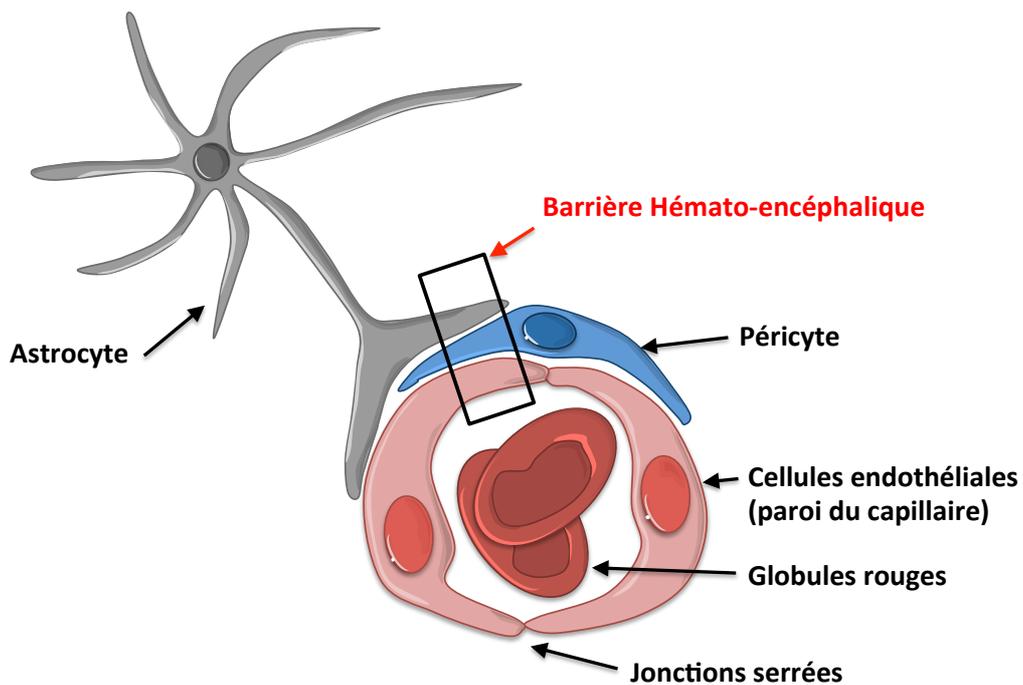


Fig 13 : Schéma de la barrière hémato-encéphalique (BHE)

Au sein du SNC, les cellules endothéliales formant la paroi vasculaire des capillaires sanguins, sont reliées entre elles par des jonctions serrées. Ces jonctions limitent les passages à travers la paroi, ce qui permet de réguler fortement les échanges entre le compartiment vasculaire et le SNC. Pour renforcer les jonctions entre les cellules endothéliales, des cellules gliales, telles que les astrocytes et les péricytes, viennent entourer la paroi du capillaire. Cette organisation permet de limiter et de réguler l'infiltration de cellules vers le SNC, notamment des cellules immunitaires. Cette BHE est à l'origine de la notion de privilège immun.

en compte est la répartition des CRH-R1 et des CRH-R2 au sein d'un tissu. En effet, la différence d'affinité fait qu'à faible dose de CRH, le CRH-R1 serait d'avantage activé que le CRH-R2. Toutefois, la CRH pourrait agir via le CRH-R2 si celui-ci est fortement présent dans le tissu par rapport au CRH-R1.

4 – Passage de la CRH du SNC vers la périphérie

4.1 – La barrière hémato-encéphalique (BHE)

Pour fonctionner correctement, le SNC doit être régulé. Afin de maintenir son homéostasie, une régulation étroite du passage des cellules, des molécules et de certains ions est nécessaire entre le SNC et le reste de l'organisme. La régulation du passage de ces différents éléments se fait notamment grâce à la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cette barrière physiologique entre le SNC et le sang se compose d'une couche de cellules endothéliales étroitement liées entre elles afin de compartimenter le sang dans les capillaires sanguins pour qu'il ne se mélange pas aux fluides cérébraux (liquide céphalo-rachidien : LCR). Ces cellules possèdent des mécanismes de transport spécifiques ainsi que des vésicules. Cette couche cellulaire est entourée et soutenue par certaines cellules du SNC, les astrocytes et des péricytes, qui forment une couche supplémentaire permettant de séparer le sang du SNC (Fig 13 ; Serlin et al., 2015). Cette barrière est perméable à certains gaz comme l'O₂ et le CO₂, mais également à des molécules liposolubles qui ont la capacité de passer à travers les membranes plasmiques. Pour les molécules de taille plus importante (peptides ou protéines), le passage est étroitement régulé et restreint grâce à des mécanismes particuliers de transport permettant une transcytose (passage au travers des cellules endothéliales).

Lors d'un stress, une augmentation de la perméabilité de la BHE est observée, notamment lors d'un stress aigu, favorisant une infiltration de molécules et de cellules au sein du SNC. Plus précisément, cette augmentation de la perméabilité s'accompagne d'une augmentation de la dégranulation de vésicules contenant de l'histamine de la part des mastocytes présents au niveau du SNC. En inhibant la dégranulation des mastocytes, même en condition de stress, l'intégrité de la BHE est

maintenue (Esposito et al., 2001). D'autres études de la même équipe ont montré que l'injection d'antalarmine permet également de maintenir l'intégrité de la BHE (Esposito et al., 2002). Les mastocytes et l'association CRH/CRH-R1 sont donc au moins deux éléments importants dans le maintien de la BHE. Les cellules endothéliales composant les parois vasculaires des micro-vaisseaux sanguins au niveau du SNC expriment les récepteurs à la CRH, notamment les CRH-R1. La CRH peut donc avoir une action directe sur ces cellules endothéliales et donc sur la BHE (Esposito et al., 2003).

Il s'avère aussi que ces mastocytes expriment les récepteurs à la CRH, CRH-R1 et CRH-R2. Bien qu'aucun lien direct ne semble encore établi entre la CRH et la dégranulation des mastocytes dans le maintien de la BHE, des études réalisées sur une lignée de mastocytes humains (LAD2) ont montré que la CRH entraîne une augmentation de la production de neurotensine (Alysandratos et al., 2012). Cette molécule peut augmenter la perméabilité vasculaire, notamment au niveau de la peau et est également capable d'induire une dégranulation d'histamine par les mastocytes (Carraway et al., 1982; Cochrane et al., 1982).

La CRH joue donc un rôle important dans la régulation de la perméabilité de la BHE.

4.2 – Passage de la CRH à travers la BHE

En plus de son rôle sur le SNC et sur la BHE, la CRH a la capacité de passer dans la circulation systémique afin d'avoir une action directe en périphérie. Le passage de la CRH à travers la BHE a pu être montré grâce à des études réalisées sur des souris ayant reçu des injections intraventriculaires de CRH marquée à l'iode 125 (isotope radioactif, I¹²⁵-CRH). Ce transport ne peut se faire que dans le sens : du SNC vers la circulation systémique (Martins et al., 1996a). En effet, l'I¹²⁵-CRH est présent au niveau du sang suite aux injections d'I¹²⁵-CRH dans les ventricules cérébraux, alors qu'aucune trace d'I¹²⁵-CRH n'est observée au niveau du cerveau suite à des injections intraveineuses.

Ce passage se fait grâce à un mécanisme actif, saturable et qui nécessite un apport d'énergie (Martins et al., 1997a). En effet, afin d'identifier les modalités de transport de la CRH à travers la BHE, différentes doses d'I¹²⁵-CRH ont été injectées dans les ventricules cérébraux murins. Il s'avère que plus les doses injectées sont

importantes, plus le pourcentage d'I¹²⁵-CRH transporté diminue. Le mécanisme de transport de la CRH est donc saturable. Ceci indique que ce transport se fait via un transporteur et non par simple diffusion. De plus, la co-injection d'I¹²⁵-CRH avec de l'ouabaïne (inhibiteur des pompes sodium-potassium ATPasiques) inhibe le passage de la CRH à travers la BHE. Le transport de la CRH nécessite donc l'apport d'énergie au moins par hydrolyse de l'ATP.

Une fois dans la circulation sanguine, la CRH va pouvoir agir sur différents systèmes périphériques exprimant les récepteurs à la CRH, à savoir le cœur, les poumons, le foie, les intestins mais aussi les organes du système immunitaire tels que la rate ou le thymus (Akiba et al., 2015; Baigent and Lowry, 2000; Takahashi, 2012). Par exemple, l'équipe de Martins et al. a injecté de l'I¹²⁵-CRH au niveau des ventricules cérébraux murins et a montré la présence de CRH radioactive dans la rate (Martins et al., 1997b). Ceci permet donc d'envisager un effet direct de la CRH, qui pourrait être dose-dépendant, au niveau du système immunitaire.

5 – Le système immunitaire (SI)

5.1 – Généralités sur le SI

Au quotidien, un organisme est en contact avec une multitude de micro-organismes tels que virus, bactéries, parasites, champignons ou levures, pouvant devenir une menace pour le bon fonctionnement et le maintien de l'intégrité de l'organisme. En cas d'infection, le SI va lutter contre cette agression afin de maintenir l'homéostasie de l'organisme.

Tous ces agents pathogènes présentent à leurs surfaces des molécules (aussi appelés antigènes, Ag) qui peuvent être reconnus par le SI comme étant des éléments du non-soi. Une fois reconnus par le SI, ces éléments vont permettre l'élimination de l'agent pathogène afin de stopper l'infection.

Afin de lutter rapidement et efficacement contre ces agressions, deux types d'immunité se sont mises en place au cours de l'évolution : une immunité ancestrale appelée immunité innée (ou immunité naturelle) et une autre immunité mise en place à partir des premiers Vertébrés à mâchoires, l'immunité adaptative (ou immunité spécifique).

L'immunité innée est la première ligne de défense d'un organisme. Il s'agit d'une immunité « non spécifique ». Cette immunité se compose principalement de la voie alterne du complément (protéines solubles plasmatiques activées directement au contact de l'Ag), de cellules phagocytaires telles que les neutrophiles (les plus abondants), les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et des cellules cytotoxiques comme les cellules NK (« natural killer » ou tueuses naturelles) capables de lyse extracellulaire. Certaines de ces cellules appartiennent aussi à l'immunité adaptative. Lors d'une infection, il y a une réaction inflammatoire, une activation de la voie alterne du complément et libération de chémokines qui vont attirer les cellules immunitaires sur le site de l'infection. Ces cellules, une fois sur place, vont pouvoir reconnaître puis éliminer l'Ag.

Si l'infection est forte ou perdure et/ou s'il y a une infection intracellulaire, **l'immunité adaptative** va alors se mettre en place. Elle peut se mettre en place par exemple lorsque l'immunité innée est dépassée par la multiplication et/ou par la virulence de l'agent pathogène, mais aussi si l'agent pathogène est capable d'infecter les cellules de l'hôte. Cette immunité se compose principalement de la voie classique du complément, activable par certains isotypes d'anticorps, et des lymphocytes T (L_T) et B (L_B). Ces lymphocytes vont s'activer en présence d'Ag qu'ils vont être capables de reconnaître soit directement (pour les L_B), soit grâce à des cellules présentatrices d'Ag (CPA) (pour les L_T). Au sein des CPA, se distinguent les CPA dites « professionnelles » qui présentent le peptide antigénique au niveau d'un complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) et les CPA dites « non professionnelles », correspondant à l'ensemble des cellules nucléées de l'organisme, qui présentent un peptide antigénique via un complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I). Parmi les CPA professionnelles, les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages sont capables de produire et de présenter aux L_T helper (L_{Th}), via leur CMH II, des peptides provenant de l'agent pathogène responsable de l'infection.

L'activation de l'immunité adaptative se fait essentiellement au niveau des organes lymphoïdes secondaires tels que la rate, les ganglions lymphatiques ou encore les plaques de Peyers (situées au niveau de l'intestin) ainsi que sur le site de l'infection.

5.2 – Activation et rôle des L_T dans la réponse adaptative

Les L_T naïfs vont s'activer au contact de complexe peptides antigéniques/CMH, qu'ils sont capables de reconnaître via des récepteurs spécifiques, les TCR (récepteurs des cellules T) avec la participation des molécules membranaires CD4 ou CD8. Ces récepteurs ne sont pas capables de reconnaître directement un Ag : ils vont reconnaître des peptides antigéniques présentés par des CPA professionnelles ou non. L'activation du système immunitaire inné est donc un prérequis à l'activation de l'immunité adaptative. Une fois activés, les L_T vont devenir soit des L_T effecteurs (LTE) permettant une réponse à l'infection en cours, soit des L_T mémoires (LTM), à longue durée de vie, permettant une réponse plus rapide en cas de nouvelle infection. En fonction de leur action biologique, deux grandes sous-populations de L_T se distinguent: les L_T helper ou auxiliaires (L_{Th} ou $L_T CD4^+$) et les L_T cytotoxiques (L_{Tc} ou $L_T CD8^+$).

L'activation des $L_T CD8^+$ se fait par la reconnaissance d'un peptide antigénique présenté par une molécule de classe I (CMH I), molécule présente sur la plupart des cellules de l'organisme. Les $L_T CD8^+$ activés vont alors induire l'apoptose de la cellule infectée par un agent pathogène (ex : infection virale) ou/et de la cellule tumorale.

L'activation des $L_T CD4^+$ se fait par la reconnaissance d'un peptide antigénique présenté par une molécule de classe II (CMH II). A la différence du CMH I qui est présent sur la plupart des cellules de l'organisme, le CMH II n'est présent qu'à la surface des CPA professionnelles. Donc, seules ces CPA peuvent activer les $L_T CD4^+$. Une fois activés, ces lymphocytes vont sécréter des cytokines permettant d'augmenter l'activité de toutes les cellules immunitaires ainsi que leur prolifération. Ils vont également aider les L_B à produire des anticorps (Ac). Ces $L_T CD4^+$ sont donc un soutien de la réponse humorale en régulant l'activation et la production des Ac par les L_B . Parmi cette population de $L_T CD4^+$ (L_{Th}) activés se distinguent plusieurs sous-populations possibles, suivant les différentes cytokines secrétées par les CPA. Chacune de ces sous-populations de L_{Th} se distingue par sa propre sécrétion de cytokines. Les sous-populations de L_{Th} les mieux caractérisées et les plus étudiées sont les $L_{Th}1$, les $L_{Th}2$, les $L_{Th}17$ et les L_{Treg} (Fig 14), (Kuby et al., 2014).

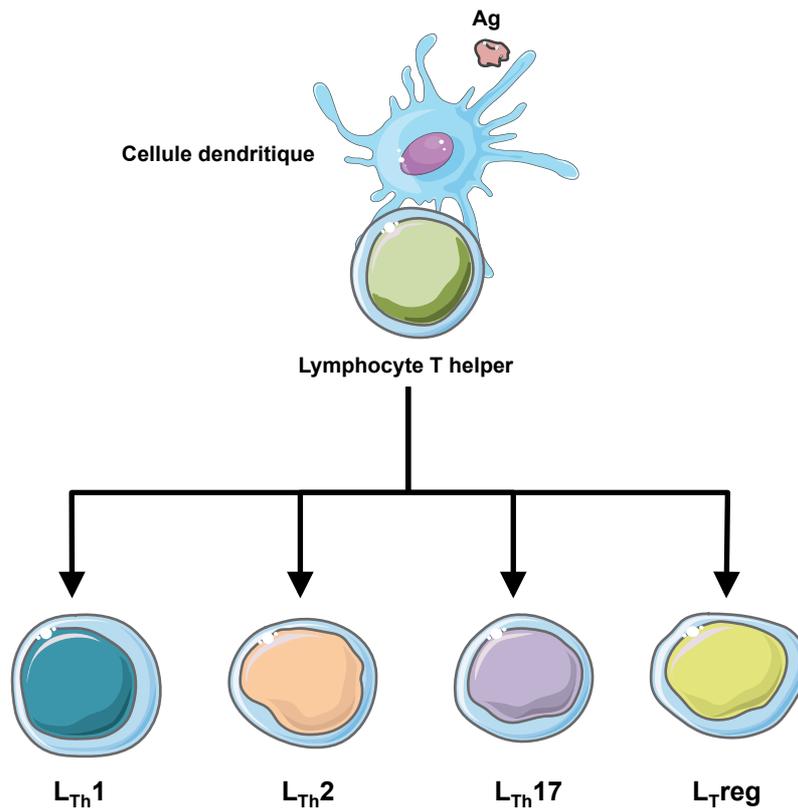


Fig 14 : Activation et sous-populations des LT helper (L_{Th} ou L_T CD4⁺)

Suite à la présentation d'un peptide antigénique par une cellule présentatrice d'antigène (CPA, ex : cellules dendritiques), le L_{Th} activé va se différencier en différentes sous-populations : L_{Th1}, L_{Th2}, L_{Th17} ou L_{Treg} sous l'influence des cytokines produites par les CPA.

- Les L_{Th1} produisent notamment de l'interféron gamma ($IFN\gamma$), du « tumor Necrosis Factor » (TNF) et de l'IL-2. Ces cytokines vont entre autres permettre la prolifération et l'augmentation de la cytotoxicité des $L_T CD8^+$ et des cellules NK afin d'éliminer les cellules infectées et/ou tumorales. Il s'agit donc d'une réponse immunitaire caractéristique d'une infection intracellulaire.
- Les L_{Th2} produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 favorisant la réponse humorale via l'activation des L_B et la production d'Ac.
- Les L_{Th17} produisent de l'IL-17 et de l'IL-22. Cette sous-population intervient dans la lutte contre des agents pathogènes extracellulaires mais elle est également retrouvée dans des maladies inflammatoires chroniques et/ou auto-immunes telles que des pathologies inflammatoires intestinales, l'arthrite ou encore la sclérose en plaque.
- Les L_{Treg} exercent un rôle tolérogène en inhibant les réponses des autres L_T , permettant ainsi de limiter leur action notamment celles des L_T auto-immuns. Cette sous-population se caractérise par la production d'IL-10 et de « tumor growth factor beta » ($TGF\beta$).

5.3 – Activation et rôle des L_B dans la réponse adaptative

Les L_B , à l'origine de la réponse humorale, peuvent s'activer de 2 façons différentes en fonction de la nature de l'Ag. En effet, 2 grands types d'Ag se distinguent :

- Les Ag protéiques dits thymo-dépendants, correspondant à la majorité des Ag lors d'une infection. La reconnaissance de ces Ag par les BCR (récepteurs des cellules B) entraîne la mise en place d'une réponse humorale avec la participation des L_{Th} . Ces BCR sont composés d'une immunoglobuline (Ig) transmembranaire, associée à un complexe de transduction de signal hétérodimérique, CD79a/CD79b (aussi appelé α/β). Ce sont les L_B de type B2, sous-population de L_B , qui sont chargés de répondre à ces Ag. Cette sous-population de cellules B2 est majoritaire au

sein de la rate ou des ganglions lymphatiques et se situe dans la zone folliculaire (FZ).

- Les Ag multivalents ou fortement polymérisés, comme les polysaccharides, peuvent être reconnus par les BCR sans la participation des L_{Th} . Ces Ag sont dits thymo-indépendants et peuvent également être reconnus par des récepteurs de l'immunité innée présents à la surface des L_B , les récepteurs de type Toll (« Toll-like receptors », TLR). Ce sont les L_B de type B1, sous-population de L_B , qui sont chargés de répondre à ces Ag. Cette sous-population minoritaire se situe au niveau des zones marginales (MZ) des organes lymphoïdes secondaires.

Tout comme pour les L_T , les L_B activés vont devenir soit des cellules à courte durée de vie, des plasmocytes (L_B effecteurs produisant des Ac) soit des cellules à durée de vie longue, des L_B mémoire (LBM), (Kuby et al., 2014).

Lors de la première rencontre avec un Ag, une partie des L_B activés va se différencier rapidement en plasmocytes et produire une grande quantité d'Ac (principalement des IgM) pour faire face à l'infection. Toutefois, ces Ac produits par les plasmocytes ont une constante d'affinité relativement moyenne pour l'Ag (de l'ordre de 10^6 - 10^7 M^{-1}). L'autre partie des L_B activés va entrer en prolifération, formant une structure éphémère au sein des organes lymphoïdes secondaires, le centre germinatif. Au sein de ces centres, les L_B vont subir d'importantes modifications de leurs gènes d'immunoglobuline (Ig) afin de produire des BCR ayant une affinité beaucoup plus importante qu'au départ pour l'Ag. Ces modifications sont dues au phénomène d'hypermutation somatique (HMS) qui permet d'induire aléatoirement des mutations dans les gènes codant les chaînes lourdes et légères des immunoglobulines. Ces mutations se faisant de façon aléatoire, les nouveaux BCR n'ont pas forcément une meilleure affinité pour l'Ag. C'est pourquoi, une étape de sélection est nécessaire afin de ne conserver que les L_B produisant des BCR de haute affinité pour l'Ag considéré. Pour cela, des cellules dendritiques folliculaires séquestrent à leur surface des Ag provenant de l'infection et vont interagir avec les L_B ayant subi ces mutations afin de ne sélectionner que ceux pouvant produire des BCR de haute affinité. Les L_B , dont le processus d'HMS n'a pas permis la production de BCR de haute affinité, sont éliminés par apoptose. Seuls les L_B produisant un BCR avec une forte affinité pour l'Ag sont conservés. Suite à cette sélection, un autre

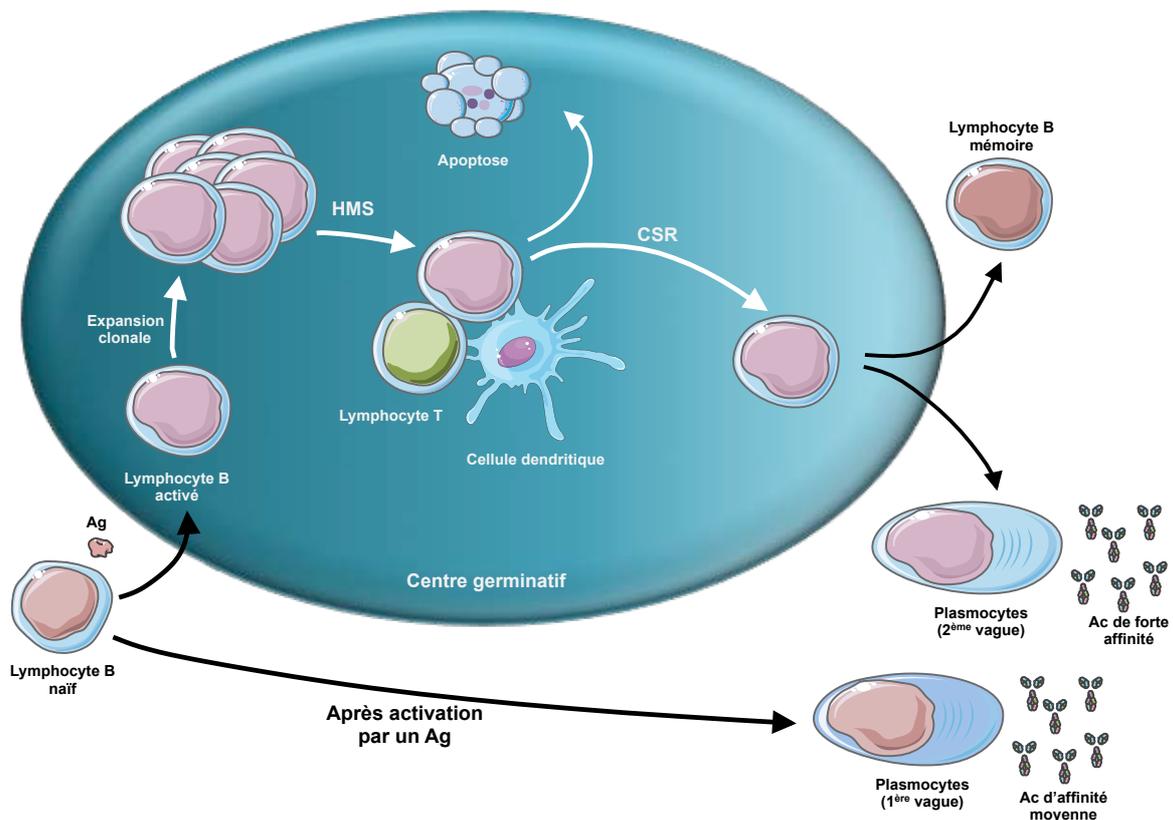


Fig 15 : Maturation des L_B au sein de la rate

Schéma des processus mis en place lors de l'activation des L_B par un antigène (Ag) permettant leur maturation et la production d'anticorps (Ac) afin de lutter contre l'infection. Ces processus, initiés par une forte activité de prolifération des L_B , donnent naissance à une structure éphémère : le centre germinatif. C'est au sein de cette structure que se déroulent les mécanismes d'hypermutation somatique (HMS) et de commutation de classe (CSR) nécessaires à l'avènement de L_B pouvant produire des Ac de forte affinité pour cet Ag. Au cours de ce processus de maturation, les L_B incapables de produire des Ac de forte affinité pour l'Ag seront éliminés par apoptose.

mécanisme va permettre de changer la partie constante des Ac (partie Fc, « fragment constant ») afin de produire de nouveaux isotypes ou sous-types d'Ig sous l'influence de cytokines faites par les L_{Th} . Ce mécanisme, s'appelle la commutation de classe des Ig (« class switch recombinaison », CSR) (Fig 15). Ces L_B vont devenir des LBM, cellules ayant une longue durée de vie. Si le même Ag revient dans l'organisme, ces LBM vont proliférer plus rapidement et une partie va se différencier en plasmocytes qui produiront des Ac de meilleure affinité que la première vague de plasmocytes (constante d'affinité pouvant aller jusqu'à 10^{10} - $10^{11} M^{-1}$), (Neuberger et al., 2000). Une autre partie va se maintenir à l'état de LBM afin de ne pas perdre ces clones de L_B très efficaces pour lutter contre l'Ag considéré. Les LBM ayant une longue durée de vie, la rapidité et la qualité de cette réponse humorale secondaire restent excellentes même si plusieurs années s'écoulent entre la première et le seconde rencontre avec l'Ag (Goodnow et al., 2010; Laffleur et al., 2014).

5.4 – Les cytokines : messagers de la réponse immunitaire

Les cytokines sont des protéines excrétées qui interviennent dans de nombreuses fonctions biologiques telles que la croissance, la différenciation ou encore l'activation cellulaire. Bien qu'elles interviennent dans différentes fonctions biologiques, leur but principal est de favoriser et de réguler la mise en place de la réponse immunitaire (Commins et al., 2010).

Les cellules immunitaires ne sont pas les seules cellules productrices de cytokines, car il est estimé que pratiquement toutes les cellules de l'organisme sont capables d'en produire. Néanmoins, elles restent celles qui en produisent le plus en quantité et en diversité. Une des principales sources de production de cytokines reste les CPA professionnelles telles que les cellules dendritiques, les monocytes et les macrophages. Ces cellules génèrent en premier une réponse immunitaire non spécifique (immunité innée) mais elles sont également capables d'envoyer des signaux afin de guider et d'orienter la réponse immunitaire spécifique si besoin.

Parmi les cytokines produites par ces CPA, le « tumor necrosis factor » (TNF) ainsi que les interleukines 1 et 6 (IL-1 et IL-6) sont trois cytokines ayant une action pro-inflammatoire permettant notamment le recrutement et l'activation de l'immunité

spécifique. Lors d'un stress, ces cytokines sont également produites par des cellules autres que les CPA, comme les cellules endothéliales, les lymphocytes ou encore les neutrophiles. Les cytokines pro-inflammatoires produites en périphérie peuvent notamment induire une réponse nerveuse susceptible d'activer l'hypothalamus. L'hypothalamus étant le centre de la thermorégulation, son activation entraîne une fièvre (Eskilsson et al., 2014).

D'autres cytokines permettent d'orienter la réponse immunitaire. Lors d'une infection avec un agent pathogène intracellulaire, la réponse immunitaire cytotoxique est essentielle pour tuer les cellules infectées. Afin de favoriser cette réponse, des cytokines telles que les interférons de type I (ex : IFN α et IFN β) ou encore l'IL-7 vont stimuler les L_T cytotoxiques ou les cellules NK (Smyth et al., 1991). Ces cytokines sont principalement produites par les cellules infectées, les monocytes et les macrophages, mais également par les lymphocytes et les cellules NK elles-mêmes. Outre ces cytokines agissant directement sur l'activation de la réponse immunitaire cytotoxique, d'autres cytokines telles que l'IL-2 et/ou l'INF γ favorisent cette réponse de manière indirecte. Par exemple, l'IL-2 produite par les cellules NK, les cellules dendritiques activées ou encore les LT CD8⁺, oriente la différenciation des L_{Th} vers la voie L_{Th}1 qui favorise l'activation des L_T cytotoxiques et des cellules NK. Ces L_{Th}1 produisent à leur tour de l'IL-2 et de l'INF γ pour favoriser la réponse cytotoxique. Ils aident aussi les L_B à produire des Ac qui piègeront l'agent pathogène quand il est hors des cellules pour qu'il soit ensuite dégradé (par le complément, les phagocytes et/ou les cellules NK).

A l'inverse, dans le cadre d'une infection à développement extracellulaire strict, la réponse humorale prend une place plus forte pour lutter contre l'infection. Cette réponse se fait grâce aux L_B, soutenus par les L_{Th} de type Th2 qui produisent de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Pour produire ces cytokines, les L_{Th} doivent donc se différencier en Th2. Cette différenciation se fait sous l'influence de cytokines comme l'IL-4 qui peut être produite par les mastocytes, les basophiles, les cellules NK ou encore par les L_{Th} non différenciés (Liao et al., 2008). L'IL-19, une cytokine de la famille de l'IL-10, joue également un rôle important dans la différenciation des L_T CD4⁺ en Th2. Cette cytokine, produite notamment par les phagocytes, favorise l'expression de l'IL-4 qui guide la différenciation vers la voie Th2 et inhibe la production de l'INF γ qui guide la différenciation vers la voie Th1. Outre la voie Th2, la

voie Th17 intervient également dans la lutte contre des infections par des agents pathogènes extracellulaires. La production d'IL-6, d'IL-21, d'IL-23 et du TGF β favorise ainsi la différenciation des LTh en Th17 ([Littman and Rudensky, 2010](#)).

De par leurs différents rôles biologiques, les cytokines sont donc des acteurs essentiels de la réponse immunitaire et des interactions entre le SI et le SNC.

6 – La CRH, acteur des interactions entre les SNC et SI

6.1 – Présence des récepteurs à la CRH sur les cellules du SI

Dès les années 1990, il s'est avéré que la CRH pouvait passer la BHE et que différents types cellulaires en périphérie présentaient des récepteurs à la CRH ([Martins et al., 1996b](#)). Il devenait donc envisageable que l'action de la CRH ne se limitait pas à un rôle dans l'axe HHS, ni à un rôle uniquement dans le SNC.

Le passage de la CRH à travers la BHE et sa fixation au niveau de la rate (cf : 1.4.2) a ouvert une autre piste pour comprendre l'impact du stress sur le SI. Auparavant, les effets du stress sur le SI étaient principalement attribués aux glucocorticoïdes. Par la suite, différentes études ont permis d'identifier la présence de récepteurs à la CRH au niveau des différentes cellules du SI. Ces récepteurs se retrouvent aussi bien au niveau des cellules immunitaires du sang périphérique qu'au niveau du thymus, des ganglions lymphatiques ou encore de la rate ([Mousa et al., 2003](#); [Radulovic and Spiess, 2001](#); [Radulovic et al., 1999](#)). Il s'avère que parmi les cellules du SI, quasiment toutes les cellules semblent les exprimer (CRH-R1 et/ou CRH-R2). En effet, les cellules de l'immunité innée telles que les granulocytes (neutrophiles, éosinophiles et mastocytes), ([Kim et al., 2011](#); [Radulovic et al., 2000](#)) ainsi que les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques appartenant aux deux immunités, expriment les deux types de récepteurs à la CRH. Les cellules de l'immunité adaptative telles que les L_T expriment également les deux types de récepteurs à la CRH ([Gonzales et al., 2008](#); [Labuz et al., 2010](#); [Mousa et al., 2003](#)). Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a encore montré la présence de ces récepteurs au niveau des L_B. Dans les années 1990, une équipe a étudié la fixation de la CRH sur les cellules immunitaires circulantes chez l'Homme. Au de cette étude, une fixation de la CRH a été observée au niveau des monocytes/macrophages et des L_T

cytotoxique. Cependant, aucune fixation de la CRH n'a été observée au niveau des L_{Th} et des L_B (Audhya et al., 1991). Toutefois, cette étude de fixation a été réalisée en incubant les cellules avec de la CRH uniquement pendant 30 min à 4°C. Ces conditions n'étant pas physiologiques, il se pourrait qu'une fixation plus tardive se fasse, notamment si les cellules expriment un récepteur ayant une affinité plus faible pour la CRH.

6.2 – Rôles direct et indirect de la CRH dans l'inflammation

La CRH est à l'origine de la cascade d'activation de l'axe HHS qui conduit à l'augmentation de la production des glucocorticoïdes, connus pour avoir une action anti-inflammatoire : la CRH a donc une action anti-inflammatoire indirecte (cf 1.2.4).

Toutefois, la CRH semble également pouvoir agir directement sur l'inflammation. En effet, puisque la CRH possède des récepteurs sur pratiquement toutes les cellules du SI, elle peut potentiellement agir directement sur la réaction inflammatoire. Pour évaluer cette action de la CRH, des études ont été réalisées *in vitro* sur une lignée cellulaire de macrophages murins RAW 264.7 et *in vivo* sur des souris Balb/c toutes deux stimulées avec du lipopolysaccharide (LPS), constituant obligatoire de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Les résultats montrent que la CRH potentialise la réaction inflammatoire induite par le LPS. En effet, la production d'IL-1 β (cytokine pro-inflammatoire) est plus importante lors d'une co-stimulation LPS/CRH que lors d'une simple stimulation avec le LPS. Afin de savoir si cette potentialisation passe par l'activation du CRH-R1, de l'antalarmine (antagoniste spécifique du CRH-R1) a été utilisée. Il s'avère que la réaction inflammatoire induite par le LPS et la CRH est fortement diminuée en présence d'antalarmine (Agelaki et al., 2002). Une autre étude réalisée *in vitro* avec des échantillons sanguins, provenant de patients atteints de dermatite atopique (AD), incubés avec de la CRH montre une diminution significative de la production d'IL-10 par rapport aux échantillons provenant de patients contrôles (Oh et al., 2012). L'IL-10 est une cytokine pouvant avoir une action anti-inflammatoire et capable de promouvoir l'immunité innée (Ouyang et al., 2011). Cela montre bien que la CRH peut agir directement sur la production de certaines cytokines.

L'ensemble de ces études montre donc que la CRH peut avoir une action anti-inflammatoire indirecte via les glucocorticoïdes et qu'elle peut avoir une action pro-inflammatoire directement en périphérie.

6.3 – Impact de la CRH sur l'immunité adaptative

6.3.1 – Impact de la CRH sur le thymus et la rate

Chez les souris n'exprimant plus la CRH (CRH-KO), une augmentation du nombre de cellules au sein du thymus et de la rate est observée, sans pour autant changer les ratios des sous-populations de L_T et de L_B au sein de la rate (Sato et al., 2010). La CRH interviendrait donc dans la régulation des populations cellulaires présentes dans ces organes lymphoïdes en limitant notamment leur nombre.

Chez les souris transgéniques surexprimant la CRH (CRH-tg), une forte diminution du nombre de cellules est observée au niveau de la rate. De plus, les sous-populations spléniques présentent une altération du ratio L_B/L_T en faveur des L_T et il existe un blocage des L_B au stade immature (L_B exprimant des IgM de surface mais pas d'IgD). Ces études ont également révélé une altération de la réponse humorale suite à la surexpression de la CRH avec une diminution de la production d'anticorps, une altération de la commutation de classe (CSR) permettant les changements d'isotype des immunoglobulines, ainsi qu'une altération de la maturation de l'affinité des anticorps (Murray et al., 2001). La CRH a donc une incidence sur le SI, notamment au niveau de la rate, avec un impact particulier sur les L_B . Pour mieux comprendre ces phénomènes, la même équipe a réalisé des immunisations sur ces souris afin d'étudier la formation des centres germinatifs au niveau de la rate. Les résultats obtenus montrent une forte diminution, voire une absence, de la formation de centres germinatifs chez ces souris surexprimant la CRH. Afin de s'assurer que la nature de l'Ag n'influe pas sur ces résultats, les immunisations ont été réalisées soit avec de la phosphocholine conjuguée à de l'hémocyanine de patelle (PC-KLH) soit avec des globules rouges de mouton défibrinés, ceci correspondant à deux Ag très différents tous deux thymo-dépendants. L'équipe a obtenu les mêmes résultats avec les deux Ag (Murray et al., 2004). Toutes ces études tendent à montrer une action directe de la CRH sur le système immunitaire. Toutefois, les souris CRH-tg utilisées

pour ces études ont un niveau basal de corticostérone plus élevé que celui des souris contrôles, dû vraisemblablement à l'augmentation de production de CRH. Il est donc difficile dans ce cas de dissocier une action directe, d'une action indirecte de la CRH via les glucocorticoïdes et ceci d'autant plus que l'absence de formation de centres germinatifs est également observée chez les souris contrôles immunisées après avoir reçu de la corticostérone. Un effet des glucocorticoïdes ne peut donc pas être écarté et ces études ne permettent pas de préciser l'action que pourrait avoir la CRH au niveau de la rate.

6.3.2 - Impact de la CRH sur les lymphocytes du sang périphérique

Peu d'études ont été menées sur les lymphocytes circulants (PBL) mais il semble qu'en plus de son action au niveau de la rate, la CRH pourrait agir dessus. Une équipe étudiant le rôle de la CRH dans la nidification de l'embryon a montré un effet biologique étonnant de cette hormone chez le rat. En effet, la CRH induit l'apoptose de PBL maternels, notamment des L_T, via la voie Fas/FasL. Ce phénomène entraînerait une immunotolérance de la mère pour l'embryon qui ne serait, de ce fait, pas reconnu comme du non-soi. Cette action biologique permettrait ainsi de favoriser l'implantation et le développement de l'embryon au niveau de l'endomètre, étapes nécessaires au bon déroulement de la gestation. L'injection d'antalarmine chez des rates gestantes, qui a pour effet de bloquer l'action de la CRH sur les CRH-R1, entraîne une diminution de l'implantation embryonnaire et donc une augmentation des fausses-couches de près de 70% ([Makrigiannakis et al., 2003](#)). Ces études montrent l'implication et l'importance de la CRH et du CRH-R1 au cours de la gestation. Chez la femme enceinte, le taux de CRH circulant augmente fortement, pouvant atteindre jusqu'à 1000 fois le taux basal. Toutefois, cette CRH n'aurait pas une origine hypothalamique mais placentaire ([Sandman and Glynn, 2009](#)). Bien que cette forte augmentation de CRH ne soit pas d'origine hypothalamique lors de la gestation, la production de CRH placentaire (pCRH) est malgré tout sous le contrôle de l'axe HHS et de l'action des glucocorticoïdes. Contrairement à leur effet inhibiteur sur la production de CRH au niveau de l'hypothalamus, les glucocorticoïdes stimulent la synthèse de pCRH ([King et al., 2001](#)).

Une autre équipe travaillant sur le cancer ovarien s'est intéressée au rôle potentiel de la CRH dans les mécanismes d'échappement des cellules cancéreuses au SI. Pour cela, des co-cultures ont été réalisées avec des lymphocytes du sang périphérique (PBL) et des cellules cancéreuses ovariennes humaines (lignées OvCa3 et A2780). Ces co-cultures ont été stimulées ou non avec de la CRH à 10 nM pendant 24h et différents tests ont ensuite permis d'évaluer l'induction d'apoptose au niveau des PBL. Il s'avère que la culture de PBL seuls, incubés avec de la CRH à 10 nM pendant 24h, présente 15% de cellules apoptotiques alors que pour la culture de PBL seuls sans CRH, le taux n'est que de 5%. La CRH peut donc induire l'apoptose des PBL.

Pour les co-cultures « PBL/cellules cancéreuses », les cellules cancéreuses ont été au préalable incubées avec de la CRH à 100 nM pendant 48h. Ces cellules ont ensuite été mises en contact avec des PBL pendant 24h pour étudier la mortalité des PBL. Les co-cultures contrôle (sans CRH) révèlent une apoptose d'environ 15% des PBL. Si la CRH est rajoutée dans ces co-cultures (PBL/cellules cancéreuses), le taux de PBL apoptotiques monte à 35%. La CRH potentialise donc l'induction de l'apoptose des PBL dans des co-cultures « PBL/cellules cancéreuses ».

Si de l'antalarmine (inhibiteur spécifique du CRH-R1) est mise au contact des cellules cancéreuses traitées avec de la CRH, le taux de PBL apoptotiques retombe aux alentours de 10%. Ainsi, l'induction de l'apoptose de ces PBL passe par l'activation du CRH-R1.

De plus, si un antagoniste du récepteur Fas (récepteur de mort cellulaire) est ajouté dans ces co-cultures traitées avec de la CRH, le taux de PBL apoptotiques retombe également aux environs de 10%. Le niveau d'expression de FasL (inducteur d'apoptose) de ces cellules cancéreuses est fortement augmenté en présence de CRH. L'apoptose induite ici passe donc par la voie Fas/FasL (ligand de Fas). Donc, en plus d'avoir un effet direct, la CRH potentialise l'induction de l'apoptose des PBL par les cellules cancéreuses. La CRH, à forte concentration, a donc un effet direct et indirect sur les PBL. En excès, la CRH est capable d'induire une mort cellulaire par apoptose, affaiblissant ainsi le SI ([Minas et al., 2007](#)).

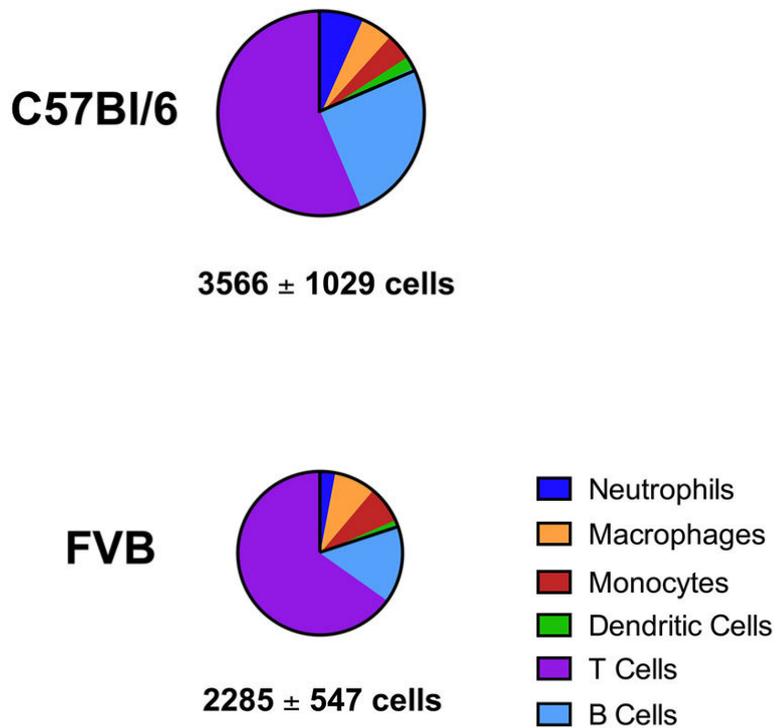


Fig 16 : Présence basale des cellules du système immunitaire au niveau du cerveau murin (Source : figure adaptée de Kim et al., 2014)
 Diagrammes représentant les proportions des différentes cellules du système immunitaire présentes au niveau des hémisphères cérébraux murins de deux lignées différentes (C57Bl/6 et FVB). Ces diagrammes montrent une présence importante de L_T (T cells) et de L_B (B cells). D'autres cellules telles que les cellules dendritiques (dendritic cells), les monocytes, les macrophages et les neutrophiles (neutrophils) sont également présentes au niveau du cerveau mais en quantité plus faible.

7 – Régulation du SNC par le SI

7.1 – Interactions entre le SI et le SNC

Le SNC fut longtemps considéré comme un système isolé et protégé du reste de l'organisme par la BHE et les feuillets méningés. Cet isolement, limitant le passage de cellules entre le SNC et l'ensemble de l'organisme, laissait à penser que les cellules du SI pouvaient très difficilement infiltrer le SNC. Seules les cellules gliales présentes dans le SNC et notamment les astrocytes, étaient décrites comme capables de répondre à la présence d'un Ag, permettant ainsi la protection du SNC. Ces cellules gliales ont une origine hématopoïétique et possèdent une activité phagocytaire semblable aux macrophages permettant ainsi de lutter contre la présence d'Ag.

Depuis les années 1990, il est reconnu que le SI peut avoir une influence sur le SNC, notamment par la sécrétion de cytokines capables d'agir sur le SNC et de le réguler. Différents récepteurs aux cytokines sont présents sur l'ensemble du SNC, notamment au niveau du cerveau, permettant ainsi l'action de ces cytokines. Au niveau de l'hippocampe par exemple, l'IL-1 β joue un rôle important dans le processus de PLT intervenant dans les capacités de mémorisation (Ross et al., 2003). A l'inverse, d'autres cytokines, telles que l'IL-6, l'IL-18 ou encore le TNF α semblent avoir une action inhibitrice au niveau de ce processus de PLT (Cumiskey et al., 2007; Tancredi et al., 2000).

Au-delà des régulations du SNC via les cytokines, la notion de « privilège immun » au sein du SNC est de plus en plus mise à mal. En effet, bien que peu de cellules immunitaires soient capables d'infiltrer le SNC, il apparaît toutefois qu'elles sont présentes notamment au niveau de l'encéphale, sans stress cellulaire particulier. Des études réalisées chez la souris ont montré la présence de lymphocytes T (L_T), de lymphocytes B (L_B), de neutrophiles, de monocytes/macrophages ainsi que de cellules dendritiques au niveau des hémisphères cérébraux (Fig 16 ; Cose et al., 2006; Kim et al., 2014). Au niveau de l'hippocampe, les L_T auraient un rôle important dans la neurogénèse et la neuroplasticité à l'âge adulte (Wolf et al., 2009; Ziv et al., 2006).

Dans le cadre de certaines neuropathies, les cellules du SI peuvent infiltrer le SNC. Une étude réalisée aussi bien sur des échantillons humains et murins montre la présence de L_T ainsi que la présence de L_B et de macrophages au niveau de l'hippocampe et du néocortex (pour la souris) chez les individus épileptiques comparés aux contrôles (Silverberg et al., 2010; Zattoni et al., 2011). Ce phénomène d'infiltration de L_T au sein de l'hippocampe ou encore du cervelet est observé dans différentes pathologies comme la sclérose hippocampique (HS) et dans certaines maladies paranéoplasiques cérébelleuses (Aye et al., 2009; Nakahara et al., 2010). Une récente étude a permis de conforter le fait que le SI pouvait infiltrer le SNC grâce à la découverte de vaisseaux lymphatiques situés au niveau des sinus de la dure-mère chez la souris, en dehors de toute stimulation antigénique (Louveau et al., 2015). Cette découverte, particulièrement importante, montre bien là encore que le SNC n'échappe pas à la surveillance du SI. L'ensemble de ces études montrent donc que le SI peut avoir une incidence sur le fonctionnement du SNC et sur ses régulations.

7.2 – Rôle du SI dans les régulations de la réponse au stress

Les interactions entre le SNC et le SI sont donc de plus en plus étudiées, favorisant l'expansion de ce domaine novateur qu'est la neuro-immunologie. Pour ce projet de thèse, les principales interactions étudiées concernent l'impact du SNC sur le SI. En effet, le SNC peut influencer le SI, notamment via la CRH lors d'une période de stress. Or, ces interactions sont à double sens. Bien que l'impact du SNC sur le SI joue un rôle important dans la régulation et le fonctionnement du SI, l'influence du SI sur le SNC revêt une importance particulière. En effet, comme de nombreuses études ont pu le montrer, le SI peut réguler le fonctionnement du SNC. Ces interactions qui mettent en avant un rôle du SI dans le fonctionnement du SNC, sont importantes notamment lors d'une exposition à un stress afin de réguler la réponse mise en place. En effet, des études ont montré que le SI peut réguler la réponse au stress mise en place par le SNC.

La production de glucocorticoïdes, tels que le cortisol ou la corticostérone, augmentée par l'activation de l'axe HHS en réponse à un stress, a principalement une action anti-inflammatoire. Lors d'une infection, la production de cytokines pro-

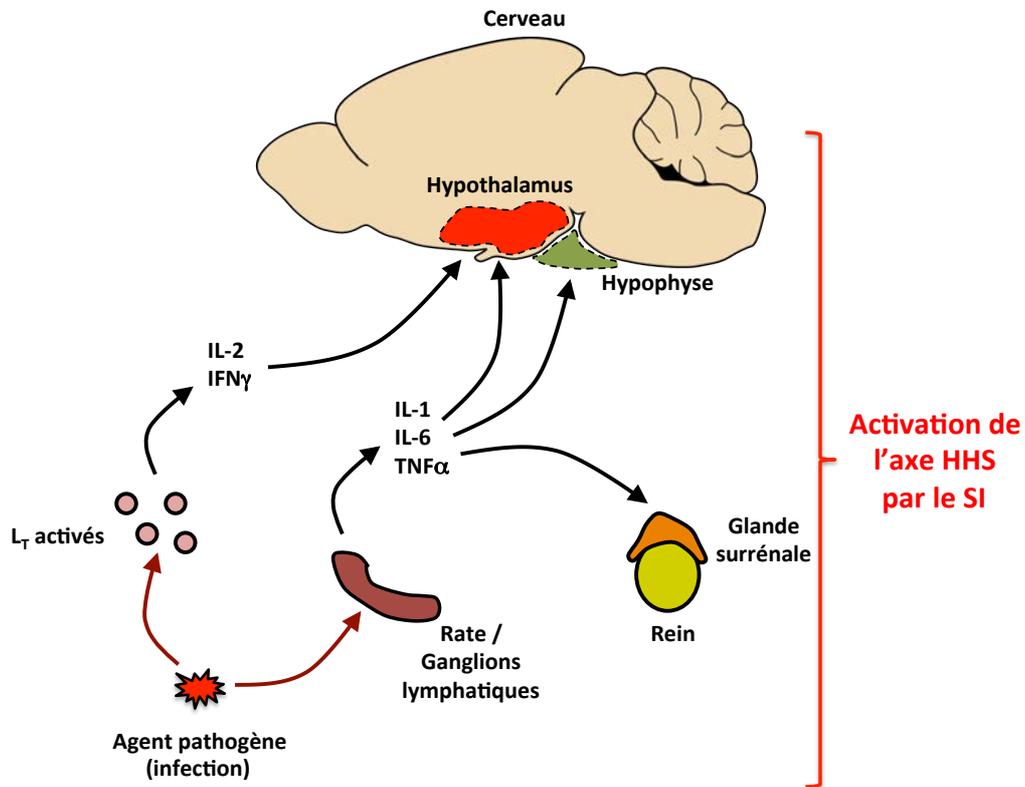


Fig 17 : Impact du SI sur l'activation de l'axe HHS

Schéma de l'activation de l'axe HHS (hypothalamo-hypophyso-surrénalien) lors d'une infection. L'activation du SI entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires (ex : IL-1, IL-6 et TNF_α) ou d'autres cytokines telles que l'IL-2 ou l'interféron gamma (IFN_γ). Ces cytokines peuvent ensuite entraîner l'activation des trois structures impliquées dans la réponse au stress (hypothalamus, hypophyse et glandes surrénales) augmentant ainsi l'activation de l'axe HHS et donc la production de CRH et de glucocorticoïdes.

inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 ou encore le $TNF\alpha$ va entraîner la stimulation, grâce à la présence de leurs récepteurs, des trois structures de l'axe HHS (hypothalamus, hypophyse et glandes surrénales). L'activation de l'axe HHS conduit à une augmentation de la production de CRH, d'ACTH et des glucocorticoïdes (Silverman and Sternberg, 2012). Ces cytokines constituent donc une forte connexion entre le SI et le SNC en ayant la capacité d'induire l'activation de l'axe HHS (Fig 17).

En plus de ces cytokines pro-inflammatoires, il semblerait que l'IL-2 et l'interféron gamma ($IFN\gamma$), produits par les L_T activés, puissent également entraîner une activation de l'axe HHS en induisant notamment la transcription de la CRH au niveau du PVN de l'hypothalamus et de l'amygdale (Kusnecov et al., 1999; Silverman et al., 2005).

Tous ces exemples montrent que les interactions qui existent entre le SI et le SNC, notamment via la production de cytokines, sont très importantes dans les régulations de la réponse au stress et l'activation de l'axe HHS.

Une meilleure compréhension des interconnexions existant entre le SNC et le SI est donc nécessaire afin d'envisager de nouvelles cibles permettant de pallier aux altérations qui peuvent survenir, en condition de stress. Vu les différentes actions de la CRH dans ces interactions, ce peptide représente une cible d'étude des plus intéressantes.

II – Objectifs du projet

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié les régulations des systèmes nerveux central (SNC) et immunitaire (SI) en condition de stress. Vu l'importance de la CRH dans la mise en place de la réponse lors d'une exposition à un stress, nous nous sommes tout particulièrement intéressés au rôle du système CRH/CRH-R dans ces régulations.

Deux principaux objectifs ont été définis dans le cadre de ce projet de recherche.

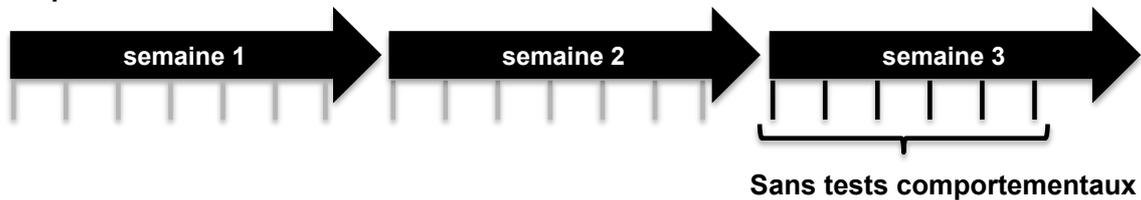
Comme décrit dans l'introduction, les récepteurs à la CRH (CRH-R1 et CRH-R2) sont exprimés dans l'ensemble du SNC et notamment au niveau du cervelet. Au niveau de cette structure, les récepteurs sont présents dans le cortex cérébelleux mais aussi dans les noyaux profonds d'où partent les efférences cérébelleuses. Le cervelet est une structure importante intervenant dans la régulation des fonctions de coordinations locomotrices. Or, ces fonctions sont souvent altérées en condition de stress. Le fait que le cervelet exprime les récepteurs à la CRH et que cette hormone soit un acteur majeur de la réponse au stress, pose la question du rôle du système CRH/CRH-R au niveau de cette structure. Bien que les deux types de récepteurs à la CRH (CRH-R1 et CRH-R2) soient présents au niveau du cervelet, la meilleure affinité de la CRH pour le CRH-R1 amène la question du rôle du couple CRH/CRH-R1 au sein de la structure. Ainsi, le premier objectif de cette thèse a été d'étudier le rôle du CRH-R1 au sein du cervelet, en condition de stress.

Outre leur présence au sein du SNC, les récepteurs à la CRH (CRH-R1 et CRH-R2) sont également exprimés en périphérie, notamment au niveau du SI. La présence de ces récepteurs a été décrite sur les monocytes/macrophages, les granulocytes, les cellules dendritiques et les L_T . Par contre, à ce jour, aucune étude ne fait mention de la présence, ou non, de ces récepteurs sur les L_B . Pourtant, les récepteurs CRH-R1 et CRH-R2 sont exprimés au niveau de la rate, lieu d'activation et de maturation des L_B lors d'une infection. Les L_B sont les cellules productrices d'anticorps, actrices de la réponse humorale or, lors d'un stress, une altération de cette réponse peut être observée. Comme la CRH peut passer la BHE pour agir en périphérie, il est possible d'envisager une action directe de la CRH sur le SI. Dans la deuxième partie de ce projet de thèse, nous avons donc cherché à évaluer l'impact

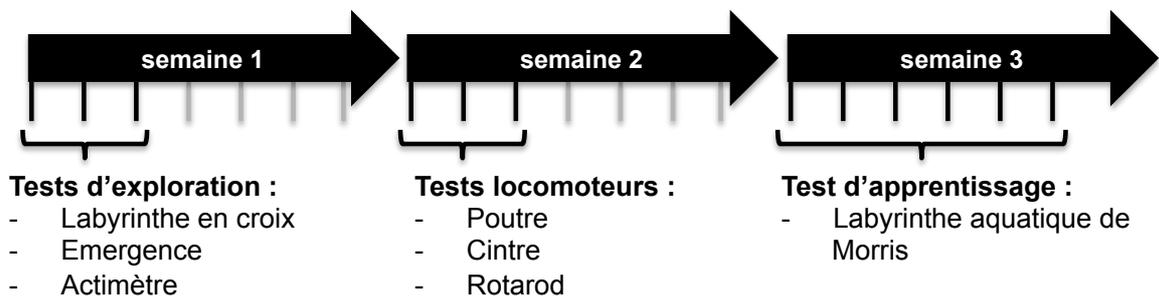
direct de la CRH sur les splénocytes murins grâce à des stimulations *in vitro*. Une attention particulière a été portée aux L_B. Nous avons cherché à caractériser la présence des récepteurs à la CRH au sein de cette population cellulaire, afin de savoir si une action directe de cette hormone est possible. Une fois ces récepteurs caractérisés au sein des L_B, nous avons cherché à évaluer quelle(s) voie de signalisation pouvaient être activées par la CRH car, bien que la présence de ces CRH-R soit déjà décrite sur d'autres cellules du SI, peu de données sont actuellement disponibles sur les voies de signalisation initiées par la CRH.

Injections de corticostérone :

Exp 1 :



Exp 2 :



Injections « corticostérone/Antalarmine » :

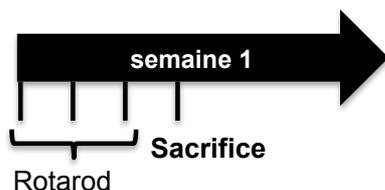


Fig 18 : Schéma des protocoles utilisés chez la souris *in vivo*

Représentation des protocoles utilisés dans le cadre des études d'injection de corticostérone et/ou d'antalarmine. Lors de la première expérience (exp1), les souris ont reçu une injection quotidienne de corticostérone à 15 ou 30 mg/kg pendant 6 jours. Le 6^{ème} jour, elles ont été sacrifiées 1h après injection. Pour la seconde expérience (exp2), les souris ont reçu trois jours d'injection de corticostérone à 15 ou 30 mg/kg les deux premières semaines et, six jours d'injection la troisième semaine. Après chaque injection, elles ont réalisé un test comportemental 1h après injection. Le 6^{ème} jour de la troisième semaine, elles ont été sacrifiées après le dernier test de comportement.

Une troisième étude (exp3) a été réalisée avec des co-injections quotidiennes de corticostérone à 30 mg/kg et/ou d'antalarmine à 10 mg/kg pendant 4 jours. Les 3 premiers jours, les souris ont réalisé le test du rotarod 1h après injection. Le 4^{ème} jour, elles ont été sacrifiées 1h après injection.

Flèches noires : semaines d'expérimentation ; barres horizontales grises : jours sans injection ; barres horizontales noires : jours d'injection

III – Matériels et méthodes pour la partie neurosciences

1 – Animaux

Pour toutes les études, des souris C57Bl/6J mâles (Charles River, France), âgées de 14-18 semaines ont été utilisées. Les souris ont été hébergées dans des cages en plexiglas transparent (longueur : 30 cm, largeur : 11 cm, hauteur : 12 cm), placées dans des armoires ventilées (A-box, Noroit, France) et maintenues dans des conditions standard de luminosité (cycles de 12 h de lumière / 12 h d'obscurité) avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Toutes les expérimentations *in vivo* ont été conduites selon les directives de l'Union européenne (2010/63/UE) et la législation en vigueur au sein de l'université de Lorraine (n° d'agrément : CELMEA-2012-0008).

2 – Solutions et protocoles d'injection

Une première expérience (n = 7/groupe) a été réalisée avec des injections de corticostérone (Tocris, R&D Systems, France). La corticostérone a été solubilisée à des concentrations de 15 et 30 mg/kg (soit 3 et 6 mg/mL respectivement) dans une solution de sérum physiologique (NaCl 0,9%) contenant du DMSO à 100 mM. Les injections ont été réalisées par voie intra-péritonéale avec un volume d'injection de 5 mL/kg, suivant le protocole défini dans la **Figure 18**. Un groupe de souris, ayant reçu du sérum physiologique avec du DMSO à 100 mM, a servi de contrôle. Le dernier jour de l'étude, les souris ont été mises à mort 1h après l'injection sous isoflurane (AbbVie, France) grâce à une station d'anesthésie mobile (Minerve, France) afin de récupérer les cerveaux et le sang.

Une seconde étude a été réalisée avec des injections de corticostérone selon le même protocole défini précédemment (n = 10/groupe). Une heure après chaque injection, une batterie de tests comportementaux a été réalisée chaque jour, selon le protocole présenté **Figure 18**. Tout comme pour la 1^{ère} expérience, un groupe de souris ayant reçu du sérum physiologique avec du DMSO 100 mM a servi de groupe contrôle. Le dernier jour de l'étude, les souris ont également été mises à mort sous

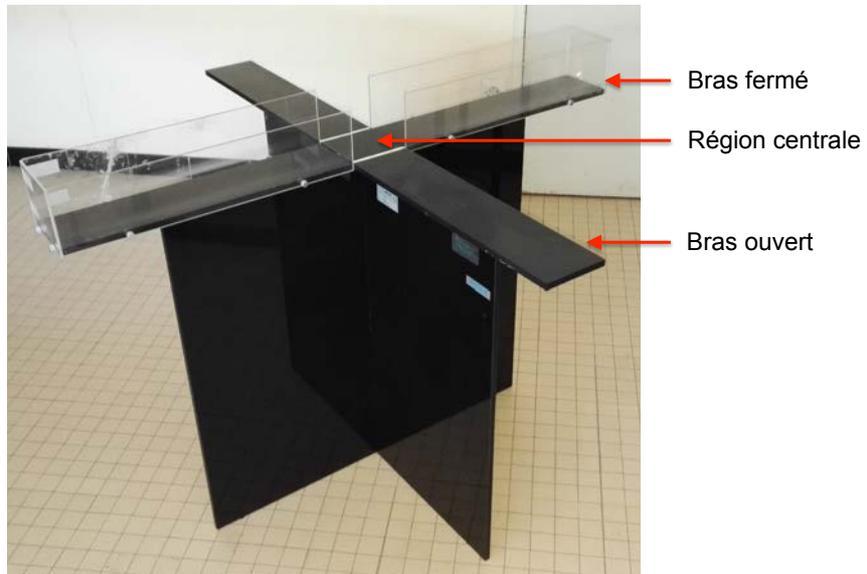


Fig 19 : Labyrinthe en croix surélevé

Photo du labyrinthe en croix surélevé possédant 2 bras ouverts, 2 bras fermés et une région centrale où l'on dépose la souris au début de l'expérimentation. Le labyrinthe est surélevé à une hauteur de 68 cm.

isoflurane après leur dernier test comportemental et, les cerveaux et le sang ont été prélevés pour la suite des expériences.

Une troisième expérience (n = 12/groupe) a été réalisée avec des co-injections de corticostérone à 30 mg/kg et d'hydrochloride d'antalarminine (Axon Medchem, Pays-Bas) à 10 mg/kg, toujours avec un volume d'injection de 5 mL/kg. La corticostérone et l'antalarminine ont toutes deux été solubilisées dans du sérum physiologique avec du DMSO à 100 mM et injectées par voie intra-péritonéale. Pour cette expérience, toutes les souris ont quotidiennement reçu une double injection, à savoir deux injections de sérum physiologique avec du DMSO à 100 mM pour le groupe contrôle ou une injection de corticostérone suivie d'une injection de sérum physiologique pour le groupe « cortico » ou une injection d'antalarminine suivie d'une injection de sérum physiologique pour le groupe « Ant » ou alors, une co-injection de corticostérone et d'antalarminine pour le groupe « cortico/Ant ». Une heure après chaque double injection, les souris ont effectué le test du rotarod (Fig 18). Le dernier jour, les souris ont été mises à mort sous isoflurane 1 h après les injections afin de prélever les encéphales et le sang.

3 – Etudes comportementales

3.1 – Test du labyrinthe en croix surélevé

Ce labyrinthe (Letica model LE 840, Bioseb, France) est composé de quatre bras (longueur: 45 cm, largeur: 10 cm, hauteur par rapport au sol: 68 cm) et d'une région centrale de 10 cm x 10 cm dont le plancher est en plexiglas noir opaque (Fig 19). Parmi les 4 bras, 2 sont fermés sur 3 côtés avec des parois en plexiglas transparent de 9 cm de haut. Les 2 autres bras sont ouverts, sans parois sur les côtés. Les 2 bras ouverts et les 2 bras fermés se font face sur les côtés opposés. Les souris ont été déposées au niveau de la région centrale afin d'évaluer le nombre d'entrées réalisées et le temps passé dans chaque type de bras sur une durée de 5 min. Au début du test, la région centrale est considérée comme étant une région fermée jusqu'à l'entrée de la souris dans un bras ouvert. Pour la suite du test, cette région centrale est considérée comme étant une région ouverte lorsque la souris quitte un bras ouvert (ou une région fermée si la souris quitte un bras fermé) et ce,

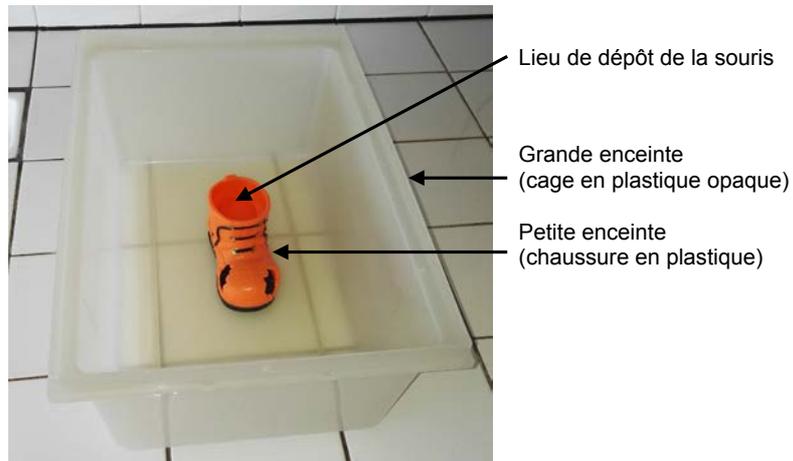


Fig 20 : Test d'émergence

Photo du test d'émergence qui se compose d'une chaussure en plastique orange (petite enceinte) placée dans une cage en plastique opaque (grande enceinte). La chaussure possède trois ouvertures dont une située au dessus servant à déposer la souris dedans.

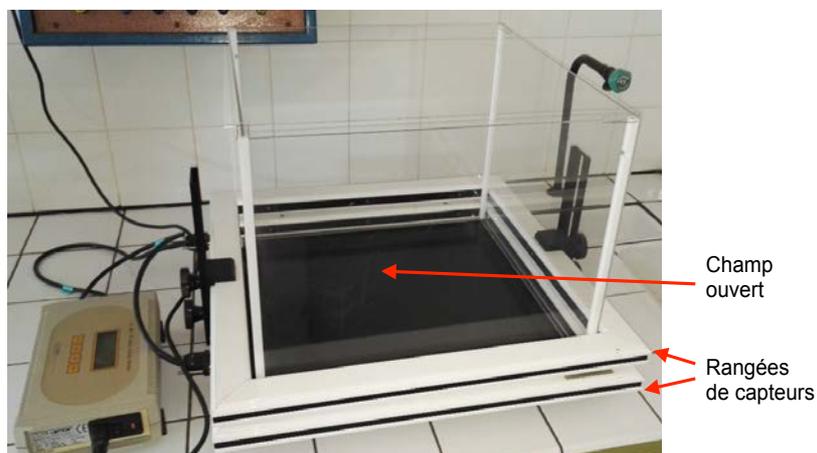


Fig 21 : Test de l'actimètre

Photo de l'actimètre constitué d'un champ ouvert entouré de deux rangées de capteurs et d'une cloison en plexiglas transparent. Les deux rangées de capteurs enregistrent les différents mouvements, stéréotypés, ambulatoires et de redressement, en différenciant les mouvements rapides des mouvements lents.

jusqu'à l'entrée dans un nouveau bras. Une entrée est prise en compte lorsque la souris a franchi avec ses 4 pattes la région concernée et qu'elle passe d'un bras à un autre. Si la souris retourne dans le bras qu'elle vient de quitter, cela n'est pas pris en compte. Si une souris chute du labyrinthe, le chronomètre est arrêté puis la souris est replacée à l'endroit de sa chute avant de redémarrer le chronomètre.

3.2 – Test d'émergence

Pour le test d'émergence, les souris ont été placées au sein d'une petite enceinte confinée (chaussure en plastique orange ; longueur : 13 cm, largeur : 6 cm et hauteur : 7,5 cm). Cet objet, possédant 3 ouvertures (environ 3 cm de diamètre), est placé au milieu d'une enceinte close (longueur : 40 cm, largeur : 27 cm, hauteur : 18 cm) en plastique opaque (Fig 20). Le temps d'émergence, qui correspond au temps que met la souris pour sortir de la chaussure, est mesuré pour 2 pattes et 4 pattes. Ces mesures ont été évaluées sur 2 essais de 5 min maximum. Un intervalle de 60 min a été aménagé entre les 2 essais. Après chaque essai, les souris ont été laissées 10 sec dans l'enceinte contenant la chaussure en plastique pour leur permettre de l'explorer.

3.3 – L'actimètre

L'actimètre (Letica model LE8811, Bioseb, France) est un appareil composé d'un plancher de 45 cm x 45 cm en plexiglas noir opaque et de parois de 36 cm en plexiglas transparent. Deux rangées de capteurs permettent de distinguer 3 types de mouvements : les mouvements ambulatoires, stéréotypés et de redressement qu'ils soient rapides (>10 cm/s) ou lents (<10 cm/s) (Fig 21).

Les souris ont été placées au centre de l'appareil et l'enregistrement des différents mouvements s'est fait de façon automatique pendant 5 min. A la fin des 5 min, la souris a été remise dans sa cage et l'actimètre a été nettoyé. Les valeurs des différents types de mouvements (redressements lents et rapides, ambulatoires lents et rapides, stéréotypés lents et rapides) ont été relevés avant le passage de la souris suivante.

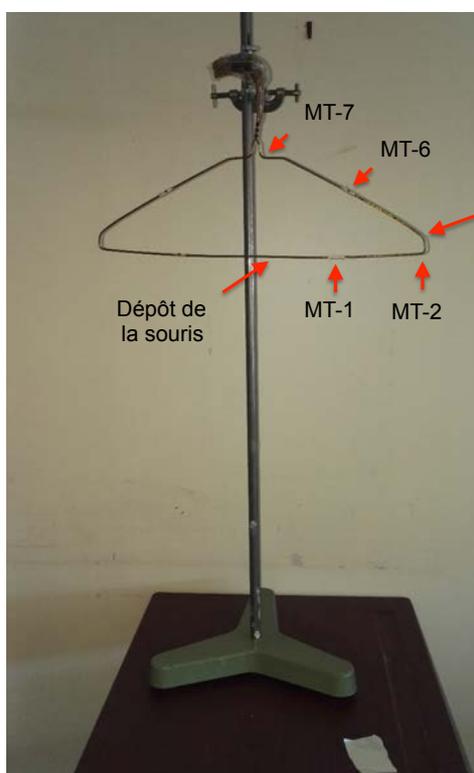


Fig 22 : Test de la poutre

Photo du test de la poutre qui se compose d'un axe circulaire de 2 cm de diamètre séparé en 11 segments équivalents. La souris est déposée sur le segment central au début du test. Des protections matelassées sont placées sous la poutre lors du test en cas de chute.

Fig 23 : Test du cintre

Photo du test du cintre qui est divisé en segments distincts (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5, MT-6 et MT-7). Au début du test, la souris est accrochée par ses 4 pattes au centre de la barre horizontale du cintre. Des protections matelassées sont placées sous le cintre pour amortir d'éventuelles chutes.



MT-5 (4 pattes)
MT-4 (3 pattes)
MT-3 (2 pattes)

3.4 – Test de la poutre

Une poutre en bois cylindrique, de 2 cm de diamètre, est placée à 70 cm du sol. Des protections matelassées sont placées au sol, sous la poutre, afin d'amortir d'éventuelles chutes. La poutre est graduée en 11 segments de 10 cm de long (Fig 22).

Pour ce test, la souris a été placée sur le segment central de la poutre et le nombre de segments franchis a été comptabilisé pendant 1 min. Pour qu'un segment soit considéré comme franchi, il faut que la souris ait passé les 4 pattes dans le segment. En cas de chute, le chronomètre est arrêté et le temps avant la chute ainsi que le nombre de segments franchis sont enregistrés avant de remettre la souris dans sa cage. Chaque souris a répété ce test 4 fois avec un temps de pause entre chaque essai d'environ 20 min.

3.5 – Test du cintre

Pour ce test, un cintre est suspendu à 40 cm d'un plan horizontal recouvert de protections matelassées prévues pour amortir les éventuelles chutes. Les souris ont été accrochées au centre de la partie horizontale du cintre. Le temps moyen nécessaire pour franchir les 7 étapes (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4, MT-5, MT-6 et MT-7 ; Fig 23) est chronométré sur une durée maximum de 60 sec. Les étapes MT-4, MT-5 et MT-6 correspondent respectivement au passage de 2 pattes, 3 pattes et 4 pattes sur la barre oblique du cintre. Si au bout d'une minute la souris n'a pas franchi l'étape MT-7, le temps maximum (soit 60 sec) est mis à toutes les étapes non franchies.

En cas de chute, le chronomètre est arrêté afin d'évaluer le temps avant la chute, puis la souris est remplacée dans sa cage. Un temps maximum est mis à toutes les étapes non franchies. Si la souris ne chute pas, le temps maximum (soit 60 sec) est comptabilisé pour la latence avant la chute. Chaque souris réalise 4 fois le test avec un temps de pause de 20 min entre chaque essai.

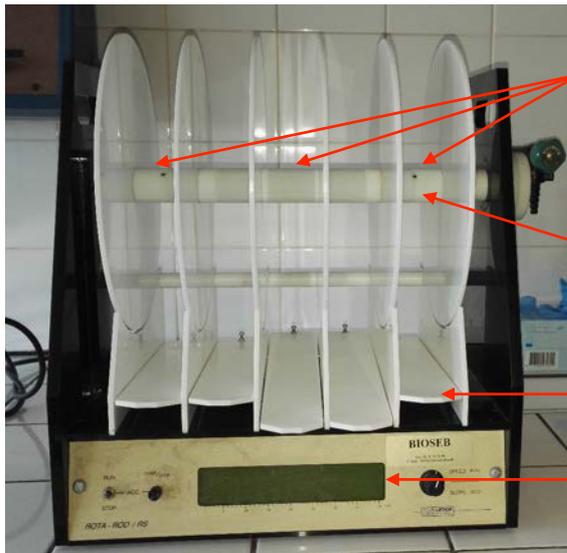


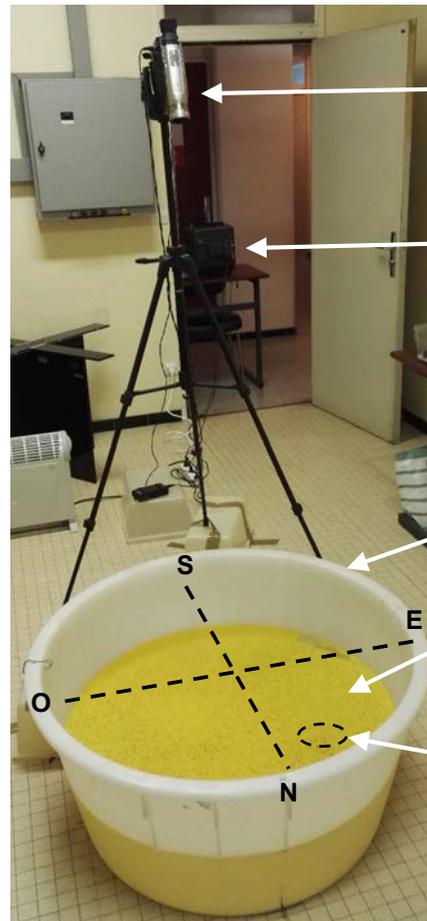
Fig 24 : Test du rotarod

Photo du rotarod constitué d'un axe rotatif divisé en 5 compartiments sur lequel les souris sont déposées (1 souris par compartiment). Au cours du test, cet axe tourne avec une accélération constante. Lorsque les souris chutent, elles abaissent automatiquement le levier qui arrête le chronomètre du compartiment concerné.

Dépôt des souris
Axe rotatif
Lever
Chronomètre

Fig 25 : Labyrinthe aquatique de Morris

Le labyrinthe aquatique de Morris est séparé en quatre cadrans définis par les quatre points cardinaux, Nord, Sud, Est et Ouest. Une plateforme immergée est placée dans le cadran Nord/Est. Des billes de plastique jaune sont placées à la surface de l'eau pour que les souris ne puissent pas voir cette plateforme immergée par transparence (à travers l'eau). Pour suivre l'évolution de la souris dans le bassin et apprécier précisément le franchissement des cadrans, un système de caméra reliée à un écran situé hors de la pièce est mis en place pour que la présence de l'observateur ne gêne pas la souris.



Caméra
Ecran
Bassin
Billes en plastique jaune
Plateforme immergée

3.6 – Test du rotarod

Le rotarod (Letica Rota-Rod/RS, Bioseb, France) est un appareil qui se compose d'un axe horizontal rotatif en plexiglas blanc de 4 cm de diamètre et strié pour éviter que les souris ne glissent. Au départ, cet axe rotatif tourne à une vitesse de 4 rotations par minute (rpm) avec une accélération constante tout au long du test (Fig 24). Les souris ont été placées sur cet axe et le temps avant la chute a été mesuré. Lorsqu'une souris tombe, elle abaisse une plaque-levier qui arrête automatiquement le chronomètre. Si une souris tourne passivement pendant 2 tours (accrochée à l'axe rotatif), le chronomètre est arrêté et la souris retirée. Chaque souris a réalisé 8 essais sur la journée avec un intervalle de 20 min entre chaque essai. Pour les analyses, le temps mesuré pour 2 essais consécutifs a été additionné. Dans le cadre de la troisième expérience (exp3) avec les injections de corticostérone et/ou d'antalarmine, les souris ont réalisé ce protocole sur 3 jours.

3.7 – Test du labyrinthe aquatique de Morris

Pour le test du labyrinthe aquatique de Morris, un bassin circulaire d'environ 90 cm de diamètre et environ 30 cm de haut est utilisé. Ce bassin est rempli aux deux tiers avec de l'eau tempérée à 22°C et à une hauteur suffisante pour recouvrir complètement une petite plateforme. Des billes en plastique jaune recouvrent toute la surface de l'eau de telle sorte que les souris ne peuvent pas voir la plateforme par transparence, à travers l'eau. Le bassin est séparé en 4 cadrans : Nord/Est (N/E), Sud/Est (S/E), Sud/Ouest (S/O) et Nord/Ouest (N/O) et la plateforme immergée est placée dans le cadran N/E (Fig 25). Durant les 5 premiers jours du test, les souris ont été déposées dans le bassin afin d'évaluer le temps mis pour embarquer sur la plateforme. Chaque jour, les souris ont réalisé 4 essais d'une minute maximum avec un intervalle de 20 min entre chaque essai. Lors de ces 4 essais, les souris ont été déposées au point Nord (N), puis aux points Est (E), Sud (S) et Ouest (O). Lorsqu'une souris a réussi à embarquer sur la plateforme, le chronomètre est arrêté et la souris est laissée 10 secondes sur la plateforme avant d'être retirée. Le temps mis chaque jour pour embarquer sur la plateforme à partir des quatre essais est additionné afin d'évaluer la progression d'apprentissage au cours des 5 jours.

Le 6^{ème} jour, la plateforme a été retirée et les souris ont été placées dans le bassin pendant une minute. Le temps passé dans le cadran N/E (où la plateforme était située les jours précédents) a été mesuré au cours de cette minute. Un second test a été réalisé 1h après pour vérifier l'absence de troubles visuels qui pourraient biaiser l'analyse des résultats. Pour ce test, la plateforme était visible et placée dans le cadran S/O. Les souris ont réalisé 4 essais à l'instar des jours précédents avec un intervalle de 20 min entre chaque passage.

4 – Coupes histologiques de cerveau et marquage histochimique de la cytochrome C oxidase (COX)

Le dernier jour du protocole expérimental (avec ou sans comportement), les souris ont été mises à mort sous isoflurane et décapitées afin de récupérer le plus rapidement possible les encéphales. Ces derniers ont alors été sectionnés longitudinalement en deux moitiés : l'hémi-encéphale droit, réservé aux coupes histologiques, a été immergé dans du N-méthyl butane à une température d'environ -40°C pendant 10 sec avant d'être mis en papillotes et stocké à -80°C. L'hémi-encéphale gauche quant à lui, a été disséqué sur un lit de glace afin de prélever 3 régions : le cervelet, l'hypothalamus et l'hippocampe.

Pour les analyses histologiques, des lames gélatinées ont été préparées : après les avoir essuyées, les lames ont été immergées dans une solution d'eau distillée contenant 0,5% de gélatine (Sigma-Aldrich, France) et 0,05% de chrome alun (Sigma-Aldrich, France) maintenue entre 40 et 50°C. Les lames ont ensuite été séchées pendant 24h à température ambiante avant de pouvoir les utiliser.

Des coupes coronales de 20 µm d'épaisseur ont été réalisées en séries au cryostat (HH505E, MIROM, France). Chaque coupe a été récupérée sur une lame préalablement gélatinée et ces lames ont ensuite été conservées à -80°C. Pour chaque cerveau, environ 8 séries de coupes ont été réalisées. Toutes les coupes de chaque série, séparées entre elles d'une épaisseur de 30 µm, tiennent sur deux lames et représentent la totalité de l'encéphale.

Pour le marquage histologique de la COX, une série de coupes pour chaque encéphale a été décongelée.

Pour préparer le marquage histologique de la COX, 8 g de sucrose ont été ajoutés à 180 mL de tampon phosphate de sodium 0,1M à pH 7.4. Cette solution sucrosée a été chauffée à 37°C sous agitation puis 40 mg de cytochrome c (Sigma-Aldrich, France), 36 mg de catalase (Sigma-Aldrich, France) et 100 mg de DAB-4HCl (3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride, Sigma-Aldrich, France) y ont ensuite été ajoutés successivement. La solution a été maintenue à 37°C sous agitation jusqu'à ce qu'elle soit bien homogène et les lames y ont été incubées environ 1 h sous agitation à 37°C à l'obscurité. Un rinçage dans du tampon phosphate de sodium sucrosé à 10% refroidi à 4°C a permis d'arrêter la réaction enzymatique puis les lames ont été fixées 30 min dans de la formaline (Sigma-Aldrich, France). Après trois lavages de 5 min dans du tampon phosphate de sodium 0,1M, les coupes ont été déshydratées dans des bains d'alcools successifs à 50°, 70° et 96° chacun pendant 3 min, suivi de deux bains d'alcool à 100° pendant 5 min et deux bains de xylène pendant 5 min. Les coupes ont alors été montées entre lame et lamelle à l'Eukitt (Sigma-Aldrich, France) et mises à sécher une nuit à température ambiante.

Pour l'analyse des marquages, des photos de chaque coupe ont été prises sur un banc optique dans les mêmes conditions de luminosité.

L'activité de la COX a été évaluée par mesure de l'absorbance régionale au moyen du logiciel ImageJ® (NIH, Whashington DC), rapportée à une échelle de niveaux de gris standard (Kodak™) pour la normalisation.

5 – Dosage de la corticostérone sérique

Après la mise à mort des souris sous isoflurane, le sang a été récupéré par ponction intracardiaque. Les échantillons de sang conservés dans de la glace ont ensuite été centrifugés à 2000 rpm pendant 20 min à température ambiante, afin de récupérer les sérums. Ces derniers ont été conservés au congélateur à -80°C en attendant le dosage de la corticostérone.

Le dosage de cette corticostérone sérique a été réalisé par test ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) selon les instructions du kit « DetectX Corticosterone Enzyme Immunoassay » (Arbor assays, Euromedex, France). Dans un premier temps, les sérums ont été dilués au 1/2 dans un tampon de dissociation du kit pour libérer la corticostérone qui pourrait être fixée à des protéines de transport et ce, afin

de doser la totalité de la corticostérone circulante. Ce mélange a ensuite été dilué au $1/25^{\text{ème}}$ dans un autre tampon du kit. En parallèle, une gamme étalon a été réalisée selon les instructions du fournisseur afin de pouvoir quantifier précisément la concentration de corticostérone des sérums. Des dilutions en cascade ont donc été réalisées à partir d'une solution de corticostérone à 100.000 pg/mL. Pour chaque échantillon, ainsi que pour chaque point de la gamme étalon, 50 μL ont été déposés dans une plaque à 96 puits préalablement immunoadsorbés avec des anticorps (Ac) reconnaissant la partie constante des IgG de chèvre. Afin de mesurer le bruit de fond lors de la révélation, 75 μL de tampon ont été déposés dans des puits nommés « NSB » (fixation non spécifique). Ensuite, 25 μL de corticostérone couplée à de la HRP (péroxydase de raifort) ont été ajoutés dans chaque puits. Enfin, 25 μL d'IgG de chèvre anti-corticostérone ont été déposés dans tous les puits à l'exception des puits « NSB ». La plaque a ensuite été recouverte d'un film adhésif protecteur puis mise à incuber 1h à température ambiante, sous agitation. Les puits ont ensuite été vidés et 3 lavages de 100 μL ont été réalisés avec un tampon de lavage 1X. Une nouvelle incubation de 30 min à l'obscurité sans agitation a été réalisée après dépôt de 100 μL de TMB (tétraméthylbenzidine) dans chaque puits. A la fin de cette dernière incubation, 50 μL de solution « stop » ont été ajoutés dans chaque puits. Les mesures d'absorbance à 450 nm ont été réalisées grâce à un lecteur de plaque (WALLAC 1420 VICTOR² microplate reader). Les valeurs obtenues pour chaque échantillon ont été normalisées grâce à la gamme étalon afin d'obtenir leur concentration en corticostérone.

6 – Extractions des ARNs et transcription inverse

6.1 – Extractions des ARNs avec du Trizol

Les extractions d'ARN au Trizol® (Thermo Scientific, France) ont été réalisées à partir des différents tissus du SNC (hypothalamus, hippocampe et cervelet) des deux premières expériences d'injection de corticostérone (exp 1 et exp 2).

Les échantillons ont été lysés dans 500 μL de Trizol®. Après une incubation d'au moins 5 min à 4°C, 100 μL de chloroforme ont été ajoutés puis le mélange a été homogénéisé au vortex. Les échantillons, refroidis pendant 2 min dans de la glace,

ont été centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. A la fin de la centrifugation, la phase aqueuse a été prélevée puis traitée à la DNase I (MBI, Fermentas, France) pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN génomique. Puis, 300 µL d'éthanol absolu ont été ajoutés dans chaque tube pour précipiter les ARNs. Après une incubation d'au moins 30 min à -20°C, les tubes ont été centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots ont été lavés dans 400 µL d'éthanol à 70%, puis centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. Cette opération a été faite une deuxième fois et les culots ont été séchés puis repris dans un volume de 20 à 50 µL d'eau ultra pure.

Pour chaque échantillon, un aliquot d'ARN total a ensuite été dosés au Nanodrop (Thermo Scientific, France) afin d'évaluer la quantité d'ARN récupérée. Un autre aliquot a été déposé sur gel d'agarose à 0,8% contenant du BET (bromure d'éthidium) afin de vérifier la qualité des ARN obtenus.

6.2 – Extractions des ARNs sur des colonnes d'affinité

Les extractions d'ARN totaux sur colonne d'affinité avec le kit « RNeasy mini » (Qiagen, France) ont été réalisées pour les tissus provenant de l'étude des co-injections de corticostérone et/ou d'antalarmine (exp3).

Les échantillons d'hypothalamus, d'hippocampe et de cervelet ont été lysés dans 600 µL de tampon de lyse (tampon RLT) puis centrifugés à 16000 g pendant 3 min à température ambiante afin de récupérer les surnageants contenant les ARNs. Dans chaque tube, 600 µL d'éthanol 70% ont été ajoutés et l'ensemble a été homogénéisé par de légers pipetages. Chaque homogénat a ensuite été déposé sur une colonne d'affinité puis centrifugé à 10000 g pendant 30 sec à température ambiante. L'éluat jeté, un premier lavage des colonnes a été réalisé avec 350 µL de tampon de lavage (tampon RW1). Les colonnes ont été à nouveau centrifugées à 10000 g pendant 30 sec à température ambiante. Après un traitement à la DNase I (Qiagen, France) pendant 15 min à température ambiante, 350 µL de tampon de lavage ont été ajoutés sur chaque colonne. Les colonnes ont ensuite été centrifugées à 10000 g pendant 30 sec à température ambiante. L'éluat jeté, deux lavages entrecoupés d'une centrifugation à 10000 g pendant 30 sec à température ambiante ont été réalisés avec un second tampon (tampon RPE) ensuite, une centrifugation à vide

| | Gènes (NCBI séquences) | Séquences des oligonucléotides (5'-3') | T°C d'hybridation (°C) | Taille (bp) |
|--------------------|-----------------------------|--|---------------------------|----------------|
| Gènes cible | NR3C1 (GR) (NM_008173.3) | F: CAAGGGTCTGGAGAGGACAA R: TACAGCTTCCACACGTCAGC | 61°C | 220 |
| | CRH (NM_205769.2) | F: GGCATCCTGAGAGAAGTCCCTC R: ACAGAGCCACCAGCAGCATG | 60°C | 128 |
| | CRH-R1 (NM_007762.4) | F: TGGTCCTGCTGATCAACTTT R: GTCTCAGATGTGGTGGATGC | 61°C | 85 |
| | CRH-R2 (NM_009953.3) | F: GGGCATCACCTACATGCTC R: CAAAGAAACCTGGAAGGAC | 62°C | 107 |
| | 11β-HSD1 (NM_008288.2) | F: TGCTTATTCTAAACCACATCAC R: TCTGCTTCAGCATGGCAAGGC | 61°C | 139 |
| | 11β-HSD2 (NM_008289.2) | F: GGTTGTGACACTGGTTTTG R: GTGGCCAGCACCGTGAAGCCC | 61°C | 71 |
| | S100A9 (NM_009114.2) | F: CACAGTTTGCAACCTTTATGAA R: GGTCTCCATGATGTCATTTATG | 61°C | 69 |
| | IL-1β (NM_008361.4) | F: TTGACGGACCCAAAAGATG R: AGAAGGTGCTCATGTCCTCA | 62°C | 203 |
| | IL-2Rα (NM_008367.3) | R: TCCCATGACAAATCGAGAAA F: CTCCTGCAGTGACCTGTAA | 62°C | 129 |
| | FasL (NM_010177.4) | F: TCCGTGAGTTCACCAACCAAA R: GGGGGTCCCTGTAAATGGG | 60 | 99 |
| Gènes de référence | Ppia (NM_008907.1) | F: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC R: GCGTGTAAGTCACCACCCT | 58°C | 150 |
| | Eef2 (NM_007907.2) | F: GTGGTGGACTGTGTCTGG R: CGCTGGAAGGTCTGGTAGAG | 58°C | 158 |
| | Eif3f (NM_025344.2) | F: CATCAAGGCCTATGTCAGCA R: GTGGTGGACTGTGTCTGG | 61°C | 117 |

Tab 1 : Oligonucléotides et conditions utilisés pour les RTqPCR

Séquences des couples d'oligonucléotides utilisés pour les gènes de référence et pour les gènes cible. Des couples d'oligonucléotides ont en plus été achetés chez Qiagen pour le CRH-R1 (n° catalogue : QT00106232) et le CRH-R2 (n° catalogue : QT00151543) afin de vérifier la présence des ADNc des CRH-R1 et CRH-R2 dans les L_B. Les couples d'oligonucléotides de chez Qiagen sont fournis pour fonctionner à 60°C.

des colonnes a été réalisée à 10000g pendant 3 min à température ambiante pour enlever toute trace de tampon sur la résine. Les colonnes ont alors été placées dans un tube de 1,5 mL et 30 µL de tampon d'éluion (eau ultra pure, H₂O up) ont été déposés sur chaque colonne. Après une incubation de 2 min, les colonnes ont été centrifugées à 10000 g pendant 1 min à température ambiante. L'éluat a été récupéré, un aliquot a servi à doser les ARN au Nanodrop et un autre a été déposé sur un gel d'agarose à 0,8% BET afin d'évaluer respectivement la concentration et la qualité des ARN.

6.3 – Transcription inverse des ARNm

Une fois les ARN totaux extraits et dosés, l'équivalent de 200 ng d'ARN a été incubé avec 1 µL de dNTPs (10 mM) et 1 µL de « random hexamers » (50 ng/µL) pour un volume final de 12 µL pendant 5 min à 65°C puis 2 min à 4°C. Un mélange contenant 4 µL de tampon RT 5X, 2 µL de DTT à 0,1 M, 0,5 µL de « RNase out » à 40 U/µL (Thermo Scientific, France) et 0,5 µL d'enzyme M-MLV à 200 U/µL (Thermo Scientific, France) a ensuite été ajouté. L'ensemble a été placé 10 min à 25°C, puis 50 min à 37°C et enfin 5 min à 70°C afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc).

7 – PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les analyses de PCR quantitative en temps réel (qPCR) ont été réalisées sur une machine « Realplex² mastercycle » (Eppendorf, France) et ont permis d'évaluer les variations d'expression de différents marqueurs tels que les récepteurs aux glucocorticoïdes (NR3C1 ou GR), la CRH, le CRH-R1 ou encore les 11β-HSD1 et 11β-HSD2 (Tab 1).

Pour chaque ARNm analysé, 1,5 µL d'ADNc a été déposé dans un mélange contenant 7,5 µL de mix « qPCR 2X Takyon » (Eurogentec, Belgique), 1,5 µL d'amorce sens à 1 µM, 1,5 µL d'amorce antisens à 1 µM (Eurogentec, Belgique) et 3 µL d'H₂O up.

Pour chaque marqueur, l'efficacité d'amplification a été évaluée et la normalisation a été faite avec 3 gènes de référence (Eef2, Eif3f et Ppia) dont la stabilité a été vérifiée pour chaque analyse, grâce à la feuille de calcul Bestkeeper ([Pfaffl et al., 2004](#)).

8 – Analyses statistiques

Pour toutes les études réalisées, l'homogénéité de la distribution des variances a été vérifiée avec le test de Levene (fichier Anastats, <http://www.anastats.fr/outils.php>). Dans le cadre d'une distribution homogène des variances, la comparaison des groupes a été réalisée par un test Anova suivi d'une comparaison deux à deux par un test de PLSD de Fisher. Si l'homogénéité des variances n'était pas vérifiée, un test de Kruskal-Wallis a alors été utilisé pour comparer les différents groupes, suivi d'une comparaison deux à deux par un test de Mann-Whitney. Pour les analyses du test du rotarod et du labyrinthe aquatique de Morris, les comparaisons ont été faites avec un test Anova à mesures répétées (pour prendre en compte les différences entre les différents groupes en fonction des différents essais) suivi d'un PLSD de Fisher. Ces différents tests ont été réalisés avec le logiciel Statview®. Pour l'ensemble des études, le seuil de significativité a été déterminé pour une valeur de $p < 0,05$. Toutefois, pour les mesures histologiques de la COX, le seuil a été placé à une valeur de $p < 0,01$ vu le grand nombre de mesures effectuées pour chaque région du cerveau.

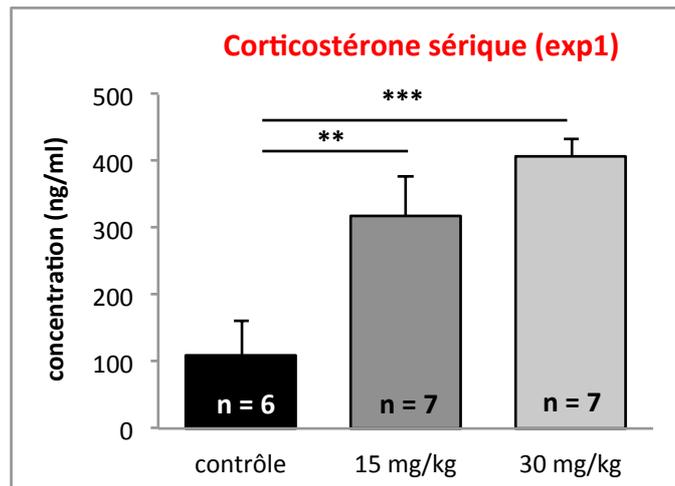


Fig 26 : Dosage de la corticostérone sérique (exp1)

Quantification de la concentration de corticostérone par test ELISA réalisé à partir de sérums provenant des souris (n = 7/groupe) ayant reçu de la corticostérone à 15 ou 30 mg/kg ou pas.

Analyse statistique par un test Anova suivi d'un PLSD de Fisher, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

IV – Résultats et discussions pour la partie neurosciences

1 – Une exposition chronique à la corticostérone altère l'expression du CRH-R1 dans le cervelet et compromet les capacités motrices chez la souris

1.1 – Impact d'une exposition chronique à la corticostérone sur l'expression de différents marqueurs impliqués dans la réponse au stress et sur l'activité métabolique du SNC

Afin d'étudier l'impact du stress sur les régulations du SNC et de comprendre le rôle que le système CRH/CRH-R1 peut jouer dans ces régulations, une première expérience (exp1) a été menée sur des souris ayant reçu des injections quotidiennes de corticostérone (15 ou 30 mg/kg) sur une durée de 6 jours. Lors du 6^{ème} jour, les souris ont été mises à mort 1h après l'injection.

Au cours de cette expérience, la masse des souris a été mesurée au début et à la fin du protocole d'injection. L'analyse de ces mesures révèle une différence non significative de gain de masse entre les différents groupes de souris. En effet, aucun gain de masse n'est observé pour les souris ayant reçu de la corticostérone (15 ou 30 mg/kg), alors que les souris contrôle ont pris en moyenne 1 gramme au cours des 6 jours de l'expérience.

Suite à la mise à mort des souris, le sang a été prélevé par ponction intracardiaque afin d'obtenir par la suite des sérums. Un dosage par test ELISA a été réalisé sur les différents échantillons afin d'évaluer le taux de corticostérone circulante pour chaque groupe de souris (Fig 26). Ce dosage révèle une forte augmentation du taux de corticostérone circulante pour les groupes de souris ayant reçu les injections de corticostérone (15 et 30 mg/kg) comparés au groupe contrôle ($F(2) = 9,78$; $p < 0,01$). En effet, la concentration de corticostérone sérique passe d'un taux basal d'environ 100 ng/ml pour les souris du groupe contrôle, à 320 ng/ml et 400 ng/ml pour les groupes de souris ayant respectivement reçu 15 et 30 mg/kg de corticostérone. Bien que le taux de corticostérone circulante soit plus faible dans le groupe de souris ayant reçu 15 mg/kg de corticostérone que dans le groupe de souris ayant reçu 30

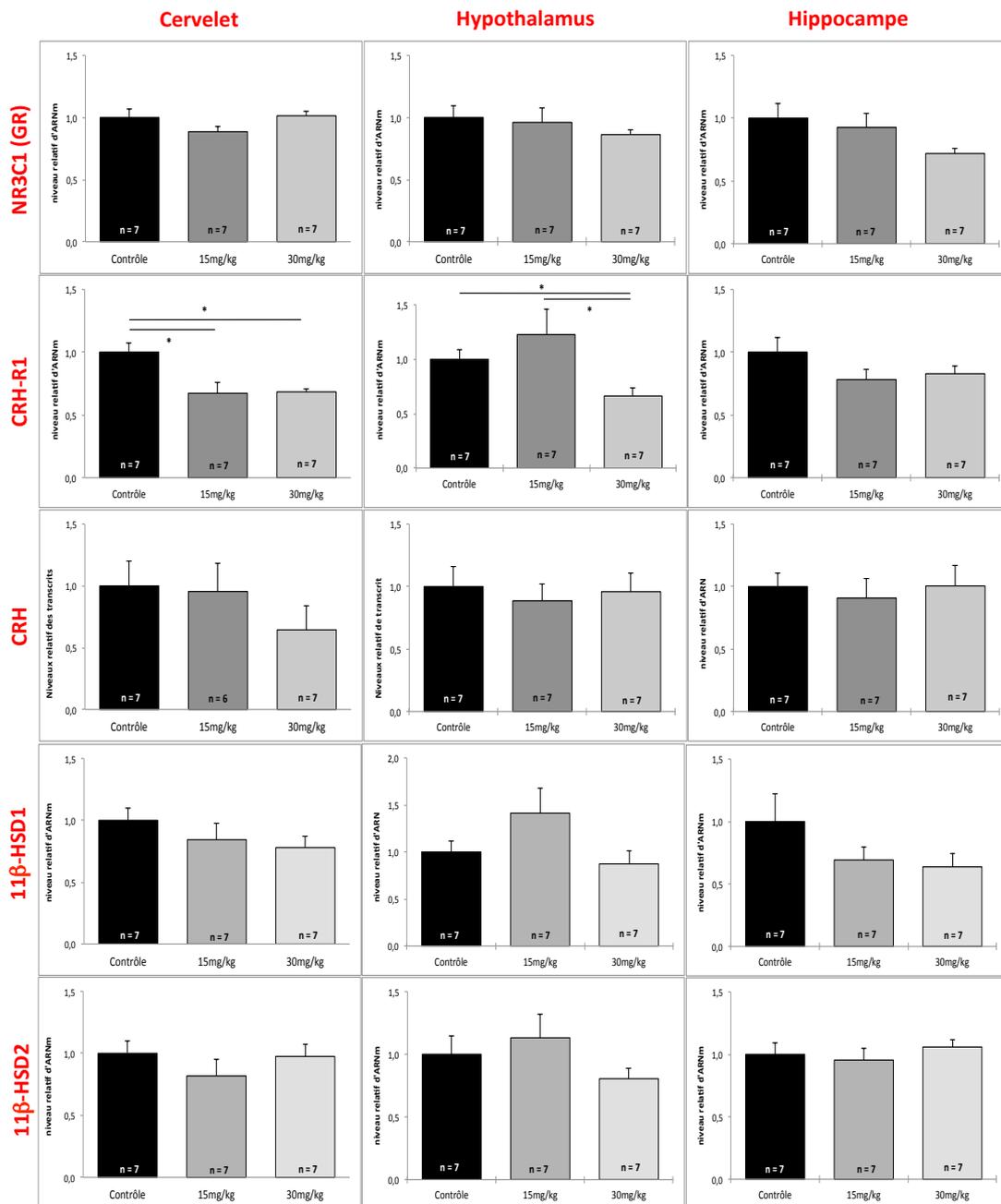


Fig 27 : Variations d'expression de différents marqueurs impliqués dans la régulation de la réponse au stress lors d'injections répétées de corticostérone à des souris (exp1)

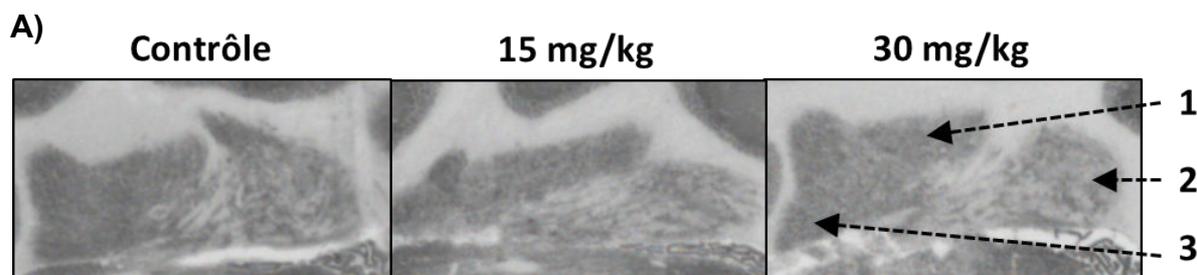
Analyses par RTqPCR de l'expression des ARNm NR3C1 (GR), CRH-R1, CRH, 11β-HSD1 et 11β-HSD2 au niveau du cervelet, de l'hypothalamus et de l'hippocampe de souris ayant reçu pendant 6 jours une injection quotidienne de corticostérone à 15 ou 30 mg/kg (n = 7/groupe).

Analyse statistique : * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001.

mg/kg de corticostérone, aucune différence significative n'a été observée entre ces deux groupes de souris.

En plus des analyses réalisées sur les sérums, les cerveaux de chaque souris ont également été prélevés puis séparés en deux dans le plan sagittal médian en deux hémicéphales. Une partie a servi aux études histologiques et sur l'autre partie, une microdissection a été réalisée afin de récupérer le cervelet, l'hypothalamus et l'hippocampe pour étudier dans ces trois régions les niveaux d'expression de différents ARNm d'intérêt par qPCR. Les analyses en qPCR des différents ARNm connus pour être impliqués dans la réponse au stress, à savoir la CRH, son récepteur de type 1 (CRH-R1), les récepteurs aux glucocorticoïdes (GR, codé par le gène *nr3c1*) ou encore les 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2, ont donc été réalisées sur les trois structures (Fig 27). Ces analyses ne montrent aucune variation entre les trois groupes de souris de l'expression des ARNm des GR ni de la CRH, et ce, dans les trois structures. Aucune variation en ARNm n'est également observée pour les deux marqueurs régulant l'activité de la corticostérone, les 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2. Par contre, une diminution de plus de 30% du niveau d'expression de l'ARNm CRH-R1 ($H(2) = 6,1$; $p < 0,05$) est observée au niveau de l'hypothalamus pour le groupe ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone. Cette diminution s'observe également au niveau du cervelet ($H(2) = 6,8$; $p < 0,05$) avec une baisse d'environ 30 et 40 % pour les groupes de souris ayant reçu respectivement 15 et 30 mg/kg de corticostérone. Ces études montrent donc une régulation de l'expression de l'ARNm du CRH-R1 lors d'une exposition à un stress au niveau de l'hypothalamus, centre majeur de production de la CRH mais également au niveau du cervelet, centre suprasegmentaire impliqué dans le contrôle des fonctions motrices.

En parallèle, l'activité métabolique d'environ 90 régions du cerveau a été évaluée par marquage histochimique de la cytochrome c oxidase (COX), (Tab 2). Les différentes régions ont été sélectionnées pour leur implication dans la régulation des fonctions cognitives, des fonctions motrices ou encore dans la mise en place et la régulation de la réponse au stress. De plus, l'étude de ces différentes régions permet d'avoir une vue globale (mais non exhaustive) de l'activité métabolique de l'ensemble du cerveau. Dans cette étude, le nombre de mesures réalisées pour chaque structure



B)

| Régions | 15mg/kg | 30mg/kg | valeur de p | Régions | 15mg/kg | 30mg/kg | valeur de p |
|------------------------------|---------|---------|-------------|-------------------------------------|---------|---------|-------------|
| Cortex cérébral | | | | Thalamus | | | |
| M1 | -3% | -10% | * | latérodorsal | -6% | -13% | $p=0,014$ |
| Visuel | -6.5% | -10% | $p=0,011$ | médiodorsal | -6% | -11% | * |
| S1 | -7% | -7% | | ventrolatérale | -6% | +3.5% | |
| Prélimbique | -4% | -9% | | ventromédian | -4% | -9% | * |
| Cingulaire | 0% | -8% | $p=0,018$ | ventropostérieur | -4% | -9% | $p=0,015$ |
| Entorhinal | -4.5% | -13% | * | CM-CL | -1% | -9% | $p=0,019$ |
| Ganglions de la base | | | | Tronc cérébral | | | |
| CPu dorsolat. | -1% | -9% | § | red, parvicell. | -7% | -10% | * |
| CPu dorsomed. | 0% | -6.5% | § | red, magnocell. | -10% | -10% | |
| CPu ventral | +1% | -5% | | Locus coeruleus | +5% | +2% | |
| SI-VP | -4% | -12% | ** | C1 region | 0% | -13% | ** , § |
| SN, compacta | -4% | -5% | | dorsal raphé | -8% | -15% | |
| SN, reticulata | 0% | -10% | $p=0,016$ | Rt pont | -7% | -11.5% | |
| VTA | -2% | 0% | | Rt tegmental | -4% | -15% | |
| Hippocampe postérieur | | | | Vestibulaire | | | |
| CA1 | -1% | -8% | * | Vest, medial PV | -6.5% | -9.5% | |
| CA2-CA3 | -2% | -8% | | Vest, latérale | -4% | -9% | |
| DG | -1.5% | -4% | | Vest, spinale | +1% | -13% | |
| subiculum | -5% | -10% | $p=0,017$ | Noyaux et cortex cérébelleux | | | |
| Septum médian | -11% | -13 | | fastigial | -6.5% | -20% | * |
| Septum latérale | -6.5% | 5% | | interposé | -8,5% | -13% | ** |
| BST | -4% | -10% | $p=0,017$ | dentelé | -11.5% | -14% | |
| Bande diagonale | 0% | -10% | | Vermis | -2% | -7% | |
| Hypothalamus | | | | Crus 1-2 | -3% | -12% | |
| Pré-optique médian | -4% | -15% | $p=0,014$ | | | | |
| paraventriculaire | -5% | -15% | | | | | |
| latérale hypo. | -7% | -8% | $p=0,019$ | | | | |

Tab 2 : Impact de la corticostérone sur l'activité métabolique régionale du cerveau de souris

Analyses de l'activité métabolique régionale par marquage histochimique de la cytochrome oxidase (COX) sur des cerveaux de souris ayant reçu des injections répétées de corticostérone (cf : protocole exp 1). **A)** Exemple du marquage histochimique de la COX. Photos des noyaux profonds cérébelleux. 1 - noyau interposé ; 2 – noyau fastigial ; 3 – noyau dentelé. **B)** Quantification du marquage de la COX. Les valeurs indiquées dans le tableau représentent les pourcentages d'augmentation ou de diminution de l'activité de la COX comparés au groupe de souris contrôle.

Symbole : * = contrôle vs 30 mg/kg ; § = 15 mg/kg vs 30 mg/kg. * : $p < 0,01$; ** : p

étant relativement important (de 4 à 10 mesures par structure et par souris), le seuil de significativité a été abaissé pour des valeurs de $p < 0,01$.

Les analyses d'absorbance révèlent une baisse de l'activité métabolique, principalement pour le groupe de souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone dans plusieurs régions du SNC, à savoir :

- **Au niveau de certains cortex** : une baisse significative de 10% au niveau du cortex primaire moteur M1 ($p < 0,01$) ainsi qu'une baisse significative de 13% au niveau du cortex enthorinal ($p < 0,01$). D'autres régions corticales présentent également une baisse de l'activité métabolique notamment au niveau du cortex visuel avec une baisse de 10% de l'activité de la COX ($p = 0,011$) ainsi qu'une diminution de 8% au niveau du cortex cingulaire ($p = 0,018$). Toutefois, les variations observées pour ces deux dernières structures sont à la limite du seuil de significativité.
- **Au niveau de certaines régions des ganglions de la base**, des baisses significatives de 6,5 et 9% sont observées, respectivement au niveau du striatum (CPU) dorsolatéral ($p < 0,01$) et dorsomédian ($p < 0,01$). Une diminution significative de 12% est également observée au niveau des régions du pallidum ventral et de la substance innominata (VP/SI) ($p < 0,001$), accompagnée d'une baisse de 10% au niveau de la substance noire réticulée (SNR) ici, à la limite de la significativité ($p = 0,016$).
- **Au niveau de l'hippocampe postérieur (ou ventral)**, une baisse significative de 8% est observée au niveau de la région CA1 ($p < 0,01$). Une diminution de 10% au niveau du subiculum ($p = 0,017$) et au niveau du noyau de la strie terminale (BST) ($p = 0,017$) sont également observées, mais ces diminutions d'activité métabolique sont à la limite de la significativité pour ces deux dernières structures.
- **Au niveau de l'hypothalamus**, aucune baisse significative de l'activité de la COX n'a pu être observée. Cependant, une baisse de 8% de l'activité de la COX, proche de la significativité est observée au niveau du noyau latéral de l'hypothalamus ($p = 0,015$) ainsi qu'une baisse de 15% au niveau de la région pré-optique médiane ($p = 0,014$). Il est également intéressant de noter qu'une baisse de 15% est observée au niveau du noyau PVN (centre producteur de la CRH), bien que cette diminution ne soit pas significative.

- **Certains noyaux du thalamus** présentent également une baisse de leur activité métabolique. Une baisse de 11% de l'activité de la COX a été constatée au niveau du noyau médiodorsal ($p < 0,01$), de 9% au niveau du noyau ventromédian (VM) ($p < 0,01$) et de 14% au niveau de l'habenula médian ($p < 0,01$). Toutes ces diminutions sont significatives. En plus de ces régions, des diminutions de l'activité métabolique proches de la significativité sont également observées dans d'autres régions du thalamus. Il s'agit des noyaux ventro-postéro-médian et ventro-postéro-latéral (VPM/VPL), avec une baisse de 9% ($p = 0,015$), des noyaux centro-médian et centro-latéral (CM/CL) également avec une baisse de 9% ($p = 0,019$) et du noyau latérodorsal ($p = 0,014$) avec une baisse de 13%.
- **Différents noyaux du tronc cérébral** présentent aussi une baisse de l'activité métabolique. Au niveau du noyau rouge parvicellulaire, une baisse de 10% est observée ($p < 0,01$) et au niveau de la région C1, une diminution de 13% ($p < 0,001$).
- **Au niveau du cervelet**, plus précisément au niveau des noyaux profonds interposé et fastigial, des baisses respectives de 13% ($p < 0,001$) et de 20% ($p < 0,01$) de l'activité métabolique sont observées.

Les différentes analyses réalisées au cours de cette expérience nous montrent donc qu'une exposition chronique de 6 jours à la corticostérone altère l'expression de l'ARNm du CRH-R1 au niveau de l'hypothalamus, mais également au niveau du cervelet. De plus, cette exposition entraîne une baisse de l'activité métabolique dans différentes régions du cerveau, notamment dans des régions connues pour être impliquées dans la régulation de la mise en place de la réponse au stress mais également dans la régulation des fonctions cognitives et des fonctions motrices.

La diminution de l'expression de l'ARNm du CRH-R1 observée au niveau du cervelet pose la question du rôle de ce récepteur et donc, de la CRH au sein de cette structure.

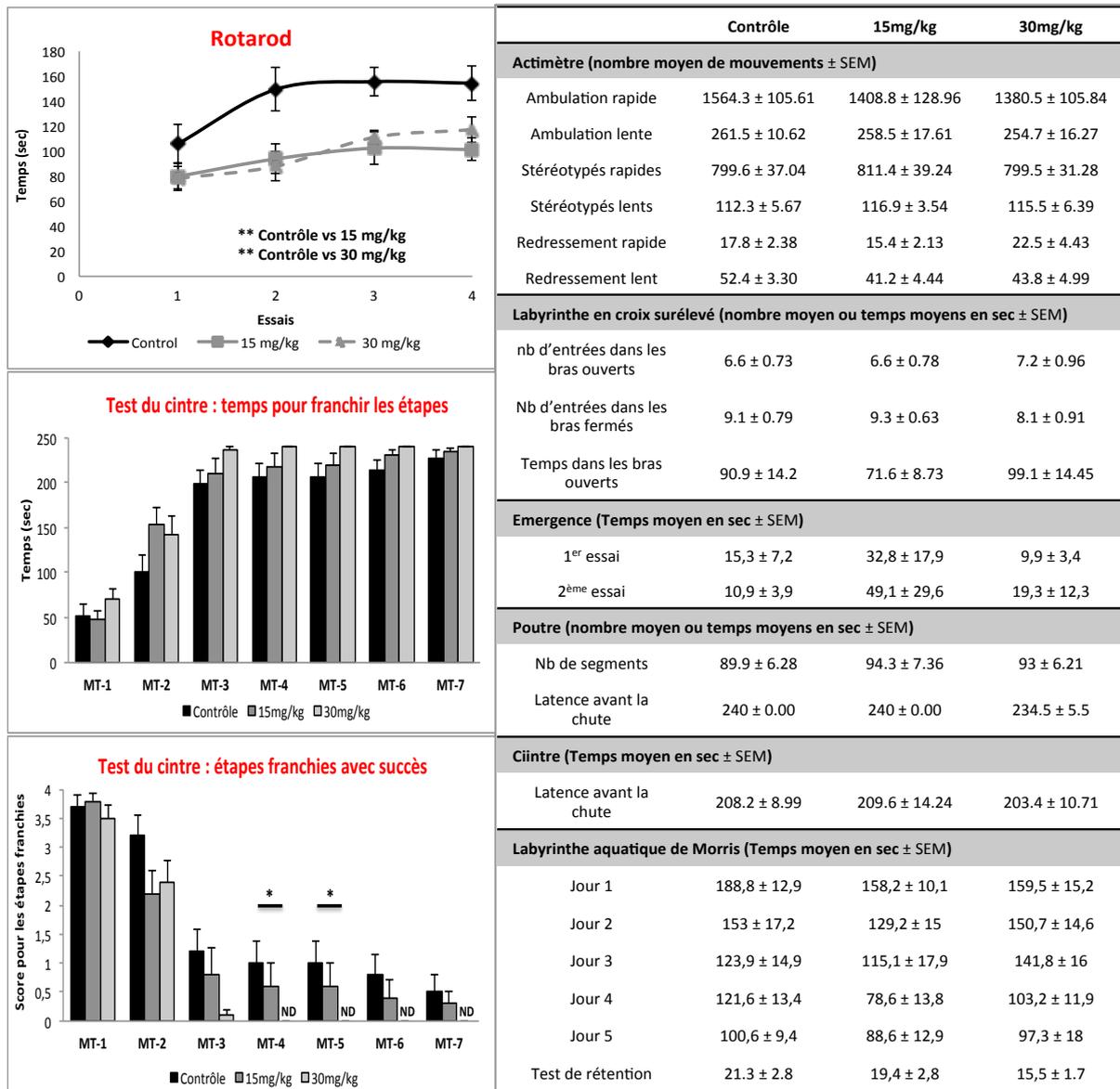


Fig 28 : Impact de la corticostérone sur les fonctions cognitives et locomotrices (exp2)

Evaluations des capacités exploratoires (actimètre, labyrinthe et croix et émergence), locomotrices (poutre, Rotarod et cintre) et d'apprentissage (labyrinthe aquatique de Morris) suite à des injections répétées de corticostérone (n = 10/groupe).

ND : non-déTECTABLE ; * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001

1.2 – Impact d'une exposition chronique à la corticostérone sur les capacités locomotrices et d'apprentissage chez la souris

Suite aux résultats obtenus lors de la 1^{ère} expérience, une nouvelle étude d'exposition chronique à la corticostérone a été réalisée. Lors de cette seconde expérience (exp 2), les souris ont réalisé différents tests de comportement 1h après chaque injection. Les différents tests mis en place ont permis d'évaluer l'activité locomotrice, l'anxiété, la coordination motrice et les fonctions visuospatiales (Fig 28). Les résultats obtenus ne montrent aucune altération de l'activité motrice et de l'anxiété dans les tests de l'actimètre, du labyrinthe en croix surélevé et le test d'émergence, pour les deux groupes de souris ayant reçu de la corticostérone comparés au groupe contrôle (Fig 28d). Par contre, des altérations sont observées dans certains tests de coordination motrice : pour les tests du cintre et du rotarod mais pas pour le test de la poutre. Dans le test du cintre, les souris ayant reçu de la corticostérone montrent un léger retard, bien que non significatif, pour franchir les différentes étapes (Fig 28b). Mais si l'on regarde plus précisément les étapes franchies avec succès, pour chacun des 4 passages, il s'avère que les souris ayant reçu de la corticostérone montrent des difficultés à franchir les différentes étapes à partir de l'étape MT-4 (correspondant au passage sur la barre oblique du cintre), (Fig 28c). Cette difficulté est d'autant plus importante que la dose de corticostérone injectée est importante. En effet, les souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone ne franchissent absolument pas cette étape MT-4 ($H(2) = 6,13$; $p < 0,05$) et ne parviennent pas à monter sur la barre oblique du cintre. Au cours de ce dernier test, la latence avant la chute a également été mesurée à chaque passage des souris. Le fait que cette latence ne varie pas en fonction des différents groupes de souris ($F(2) = 0,84$; $p > 0,05$) indique que le retard observé ne semble pas dû à une atteinte musculaire. En effet, dans le cadre d'une atteinte musculaire, les souris se fatigueraient plus facilement et tomberaient donc plus rapidement. L'altération des capacités locomotrices des souris ayant reçu de la corticostérone est confirmée avec le test du rotarod qui révèle une importante baisse des capacités de coordination locomotrice sur cet axe rotatif ($F(2) = 7,32$; $p < 0,01$). Cette altération s'observe pour les deux groupes de souris ayant reçu de la corticostérone (15 et 30 mg/kg) comparés au groupe contrôle (Fig 28a).

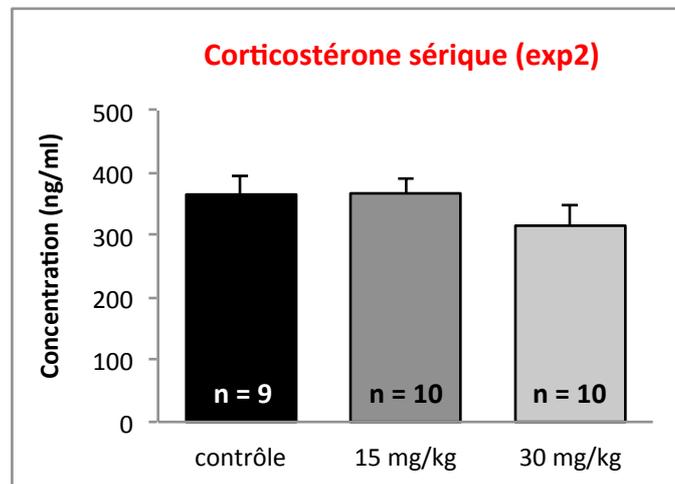


Fig 29 : Dosage de la corticostérone sérique (exp2)

Quantification de la concentration de corticostérone par test ELISA réalisé sur les échantillons de sérum provenant des souris ayant réalisé les différents tests de comportement après avoir reçu de la corticostérone à 15 ou 30 mg/kg comparés à un groupe de souris contrôle (n = 10/groupe).

Dans le labyrinthe aquatique de Morris, quelque soit le groupe de souris, le temps mis pour trouver la plateforme immergée dans le cadran nord-est (N/E) diminue au fur et à mesure des essais quotidiens. Ceci indique bien qu'il y a un apprentissage de la part des souris des trois groupes. Aucune différence n'ayant été observée entre le groupe contrôle et les groupes de souris ayant reçu de la corticostérone, on en déduit qu'il n'y a donc pas d'altération des capacités d'apprentissage chez les souris ayant reçu de la corticostérone.

Suite à ce test d'apprentissage, un test de rétention a été réalisé le jour suivant. Ce second test consiste à placer les souris dans le bassin sans plateforme et à mesurer le temps passé dans le cadran N/E, lieu où était située la plateforme lors des tests d'apprentissage. Lors de ce test, les souris restent 1 min dans le bassin. Si les souris n'ont pas mémorisé la localisation de la plateforme, elles vont avoir une exploration aléatoire dans le bassin et passer donc autant de temps dans chaque cadran (soit 15 sec par cadran). Alors que si les souris ont mémorisé l'emplacement de la plateforme, elles passeront plus de temps dans le cadran d'intérêt (soit plus de 15 sec dans le cadran N/E). Lors de ce test, les souris du groupe contrôle ont passé 21 sec dans le cadran N/E contre 15 sec pour les souris du groupe de souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone. Ce résultat n'étant pas significatif, il ne met pas en avant d'altération des capacités de rétention d'information chez les souris ayant reçu de la corticostérone.

Comme il s'agit d'un test d'apprentissage visuospatial, il est nécessaire de vérifier que les capacités visuelles des souris sont normales. Dans ce test, la plateforme visible est placée dans un autre cadran (cadran S/O) que celui utilisé pour le test d'apprentissage (cadran N/E) pour ne pas biaiser le résultat dû à l'apprentissage qui a eu lieu au préalable. Dans ce troisième test, toutes les souris quelque soit leur groupe ont rapidement trouvé et embarqué sur la plateforme visible attestant qu'elles ont bien toutes leurs capacités visuelles leur permettant de prendre des repères visuo-spatiaux pour se mouvoir correctement au sein de leur environnement.

Ce dernier test du labyrinthe aquatique de Morris ne montre donc pas d'altérations des capacités d'apprentissage ni de mémorisation. Toutefois, malgré l'absence de significativité, la légère diminution du temps passé dans le cadran N/E pour le test de rétention d'informations (21 sec pour les souris contrôle contre 15 sec pour les souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone) pourrait suggérer une légère altération dans la rétention d'informations (Fig 28d).

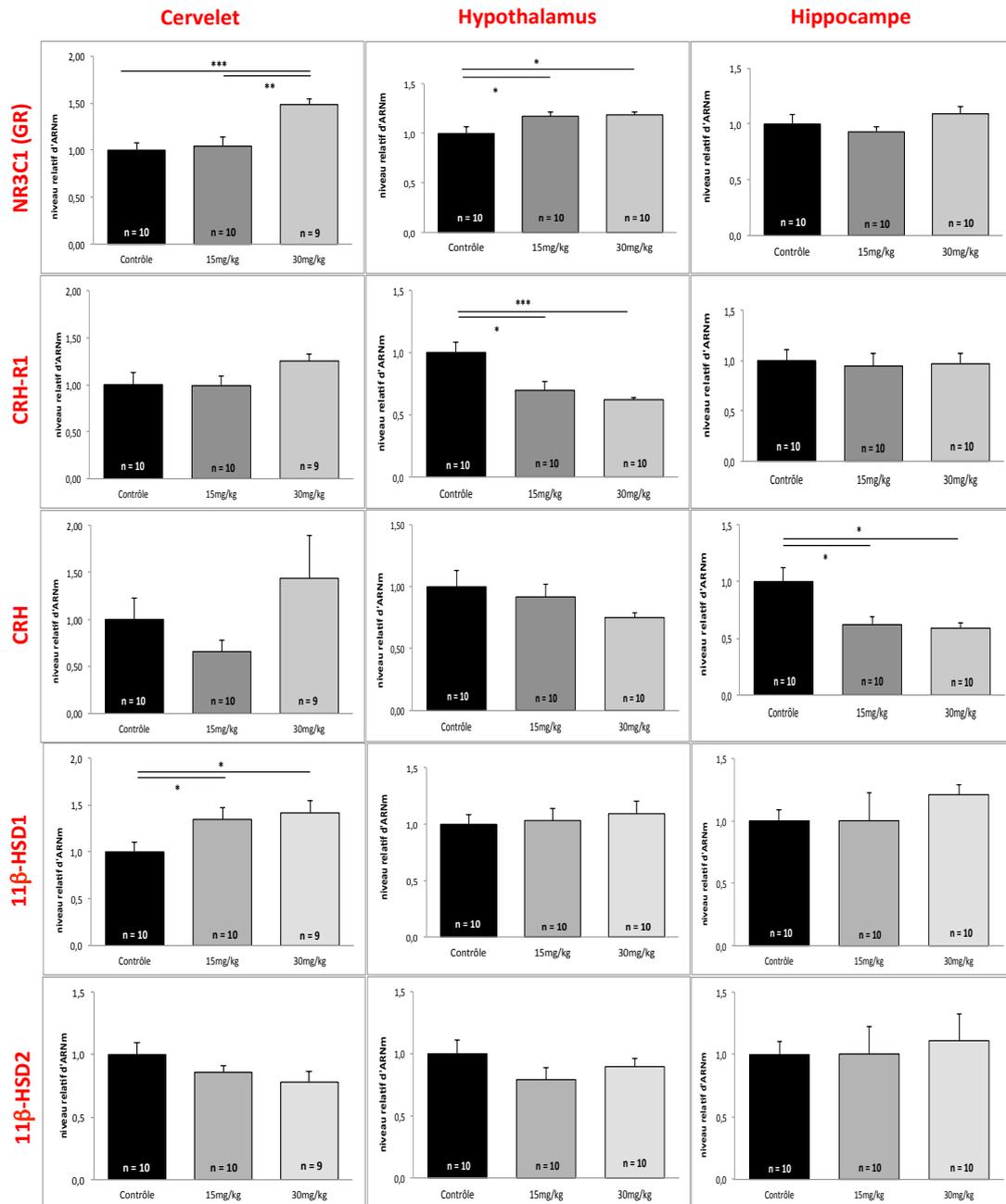


Fig 30 : Variations d'expression de différents marqueurs impliqués dans la régulation de la réponse au stress lors d'injections répétées de corticostérone à des souris (exp2)

Analyse par RTqPCR de l'expression de NR3C1 (GR), CRH-R1, CRH, 11β-HSD1 et 11β-HSD2 au niveau du cervelet, de l'hypothalamus et de l'hippocampe des souris ayant reçu des injections quotidiennes de corticostérone à 15 ou 30 mg/kg suivies de tests comportementaux (cf : protocole exp 2).

Analyse statistique : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Suite à ces études comportementales, le sang de chaque souris a été prélevé par ponction intracardiaque afin d'obtenir des sérums et de doser la corticostérone circulante. Ces dosages ne montrent pas de différences significatives entre les trois groupes de souris (Fig 29). Cependant, nous pouvons observer que le taux de corticostérone circulante est relativement élevé pour les trois groupes de souris avec une concentration moyenne aux alentours de 300 à 350 ng/ml. Dans le cadre du dosage de la corticostérone circulante réalisé pour l'exp 1, le taux basal pour le groupe contrôle était aux alentours de 100 ng/ml. Il s'avère donc que même les souris du groupe contrôle ont subi un stress avec les tests comportementaux.

Tout comme la précédente expérience (exp1), les encéphales de chaque souris ont été prélevés et coupés entre les deux hémisphères afin de réaliser les mêmes études en qPCR et en histologie. Une première partie de ces encéphales a donc permis de récupérer le cervelet, l'hypothalamus et l'hippocampe de chaque souris pour des analyses par qPCR (fig 30). Ces analyses montrent une augmentation du niveau des transcrits des GR aussi bien au niveau de l'hypothalamus (pour les deux groupes de souris ayant reçu de la corticostérone) ($H(2) = 8,83$; $p < 0,05$) qu'au niveau du cervelet (pour le groupe de souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone), ($H(2) = 13,23$; $p < 0,01$) . Une augmentation du niveau des transcrits de la 11β -HSD1 est également observée au niveau du cervelet pour les deux groupes de souris ayant reçu de la corticostérone ($H(2) = 6,98$; $p < 0,05$). Ces études révèlent également une baisse des transcrits du CRH-R1 au niveau de l'hypothalamus ($H(2) = 12,69$; $p < 0,01$) et de la CRH au niveau de l'hippocampe ($H(2) = 5,8$; $p = 0,054$) pour les deux groupes de souris ayant reçu de la corticostérone. Aucune variation des transcrits de la 11β -HSD2 n'est observée dans les trois structures, quelque soit la dose de corticostérone injectée.

En parallèle, l'activité métabolique régionale du SNC a été évaluée par marquage histochimique de la COX de la même manière que pour l'exp1 (Tab 3). Les mesures densitométriques n'ont pas révélé de grandes variations de l'activité métabolique sur l'ensemble des différentes régions mesurées. Il apparaît cependant qu'une diminution de l'activité métabolique de 11% et 13% est observée au niveau du noyau ventromédian du thalamus (VM) ($F(2) = 7,14$; $p < 0,01$) pour les deux groupes de souris ayant reçu respectivement 15 et 30 mg/kg de corticostérone. Nous pouvons

| Régions | 15mg/kg | 30mg/kg | Valeur de p | Régions | 15mg/kg | 30mg/kg | Valeur de p |
|------------------------------|---------|---------|-------------|-------------------------------------|---------|---------|-------------|
| Cortex cérébral | | | | Thalamus | | | |
| M1 | -9% | -7% | | latérodorsal | -3% | -11% | |
| visuel | -6.5% | -10% | | médiodorsal | -3% | -2% | |
| S1 | -3% | -4% | | ventrolatérale | +10% | +7% | |
| Prélimbique | -4% | 0% | | ventromédian | -11% | -13% | ** , §§ |
| Cingulaire | -6% | -2% | | ventropostérieur | -6% | -10% | |
| Entorhinal | -5% | -5% | | CM-CL | +6% | -1% | |
| Ganglions de la base | | | | Tronc cérébral | | | |
| CPu dorsolat. | +5% | -4% | | red, parvicell. | +4% | -3% | |
| CPu dorsomed. | -4% | -12% | | red, magnocell. | -4% | -8% | |
| CPu ventral | +4% | -5% | | Locus coeruleus | +6% | 0% | |
| SI-VP | +4% | -1% | | Région C1 | +7% | -2% | |
| SN, compacta | +4% | -2% | | dorsal raphé | +6% | +2% | |
| SN, reticulata | -1% | -10% | | Rt pont | +2% | -3% | |
| VTA | -2% | 0% | | Rt tegmental | +5% | +4% | |
| Hippocampe postérieur | | | | Noyaux et cortex cérébelleux | | | |
| CA1 | -1% | 0% | | fastigial | +1% | +6% | |
| CA2-CA3 | -3% | 0% | | interposé | -5% | -4% | |
| DG | -2% | -4% | | dentelé | -1% | +4% | |
| subiculum | 0% | -1% | | Vermis | +2% | -1% | |
| Septum médian | -5% | +1% | | Crus 1-2 | +3% | +2% | |
| Septum latérale | -1% | +4% | | | | | |
| BST | -8% | -1% | | | | | |
| Bande diagonale | -11% | -7% | | | | | |
| Hypothalamus | | | | | | | |
| Pré-optique médian | 0% | -6% | | | | | |
| paraventriculaire | -3% | +5% | | | | | |
| latéral hypo. | +1% | +3% | | | | | |

Tab 3 : Impact de la corticostérone et des tests comportementaux sur l'activité métabolique régionale du cerveau de souris

Analyses de l'activité métabolique régionale par marquage histochimique de la cytochrome oxidase (COX) sur des cerveaux de souris ayant reçu des injections répétées de corticostérone suivies de différents tests comportementaux (cf : protocole exp 2). Les valeurs indiquées dans le tableau représentent les pourcentages d'augmentation ou de diminution de l'activité de la COX comparés au groupe de souris contrôle.

Analyse statistique : * = contrôle vs 30 mg/kg ; § = contrôle vs 15 mg/kg et * : $p < 0,01$; ** : $p < 0,001$.

également constater une diminution de 12% au niveau du striatum dorsomédian ($F(2) = 4,125$; $p = 0,028$) pour le groupe de souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone. Bien que cette dernière diminution ne soit pas significative (Anova, $p > 0,01$), le PLSD de Fisher permettant la comparaison entre les souris du groupe contrôle et les souris ayant reçu 30 mg/kg de corticostérone indique une valeur de $p < 0,01$. En dehors de ces deux régions, noyau ventromédian du thalamus et striatum dorsomédian, aucune variation de l'activité métabolique n'a été observée.

1.3 – Discussion

L'administration de corticostérone est un moyen facile et bien contrôlé de reproduire artificiellement chez l'animal, l'exposition à un stress en augmentant le taux de glucocorticoïdes circulants (Gregus et al., 2005; Sterner and Kalynchuk, 2010). D'après la définition du stress chronique vue précédemment dans l'introduction, les injections réalisées dans cette étude sont considérées comme une exposition chronique. En effet, pour les deux expériences, les souris ont été mises à mort après 6 jours consécutifs d'administration de corticostérone et bien que le comportement ait été évalué quotidiennement 1h après l'injection, on ne peut ignorer l'effet cumulatif de la substance. En effet, Zhao et al en 2008 ont montré que 6 jours d'administration de corticostérone à 20 mg/kg à des souris mâles provoquait une diminution du temps d'immobilité des souris alors que 18 ou 36 jours d'injection provoquaient une augmentation de ce temps d'immobilité, caractéristique d'un comportement dépressif, celui-ci augmentant en fonction de la fréquence d'injections (Zhao et al., 2008). De façon similaire, une injection quotidienne de 20 mg/kg de corticostérone pendant 10 jours consécutifs, correspondant à un effet chronique, n'est pas suffisante pour induire un état dépressif chez la souris (Brotto et al., 2001). Ainsi, nous considérons que les mesures du métabolisme régional au niveau de l'encéphale ainsi que l'analyse des transcrits sont le reflet d'une administration répétée de corticostérone d'une durée trop courte pour induire un état de dépression. De plus, dans l'étude comportementale, les résultats obtenus dans les tests effectués lors des deux premières semaines peuvent être considérés comme des effets aigus de la corticostérone bien que les trois lots de souris n'aient pas effectué les tests dans le même ordre.

De nombreuses études (Gregus et al., 2005; Marks et al., 2009; Sousa et al., 2000; Zhao et al., 2008) ont rapporté un arrêt de la prise de poids des animaux lors d'injections chroniques de corticostérone et ont montré que les pertes de poids étaient dépendantes de la dose et de la durée d'injection (Johnson et al., 2006; Zafir and Banu, 2009). Par exemple, une perte de poids a été observée dès le 6^{ème} jour d'injection chez les rats recevant 40 mg/kg de corticostérone (Kott et al., 2016). Dans notre première expérience, le gain de poids moyen des souris contrôle au jour de la mise à mort est de 1g alors que celui des souris sous corticostérone reste stationnaire. Il semblerait donc que nos souris, comme cela a été décrit dans d'autres études, commencent à subir les effets de l'administration répétée de corticostérone. Cependant, cette observation n'est faite que pour les souris de la première expérience. En effet, dans la seconde expérience, les trois groupes de souris présentent un gain de poids équivalent et très faible. Il semble donc que l'entraînement physique imposé aux souris lors de la seconde expérience ait un effet bénéfique compensant l'effet délétère des glucocorticoïdes sur la masse corporelle. Sousa et al en 2000 ont montré qu'une injection de corticostérone augmentait le taux de corticostérone circulante chez le rat, pendant une durée de 4h (Sousa et al., 2000). Ainsi, les taux sériques obtenus lors de notre première étude correspondent vraisemblablement à la corticostérone administrée, toujours présente dans le compartiment vasculaire. En effet, les valeurs retrouvées sont équivalentes à celles d'un stress modéré (15 mg/kg) et d'un stress élevé (30 mg/kg). Dans la seconde expérience, les animaux ont été mis à mort environ 5h après la dernière injection. Ce laps de temps, entre la dernière injection et la mise à mort, est suffisant pour éliminer la corticostérone injectée du compartiment vasculaire. Le taux élevé de corticostérone mesuré dans le sérum représente donc certainement le taux de glucocorticoïdes produits durant le comportement, confirmant ainsi la nature stressante du test du labyrinthe aquatique. Cependant, en dépit de l'injection répétée de corticostérone, la régulation de l'axe HHS semble préservée puisque les trois groupes de souris présentent le même taux de corticostérone en réponse à une situation stressante.

Lors de cette étude, nous avons évalué l'impact d'une exposition répétée de corticostérone sur les régulations de la CRH et de son récepteur de type 1 (CRH-R1) au niveau du système nerveux central, en nous intéressant plus particulièrement au cervelet et aux fonctions locomotrices. Lors d'une exposition à un stress, l'activation

de l'axe HHS se met en place très rapidement (de l'ordre de quelques minutes) afin de répondre et de s'adapter à ce stress. Une fois l'axe activé, l'augmentation de la CRH et des glucocorticoïdes s'observe quasi immédiatement au niveau sanguin. Toutefois, le taux maximal de glucocorticoïdes au niveau du cerveau est atteint environ 1h après l'exposition à un stress, notamment au niveau de l'hippocampe (Droste et al., 2008, 2009). C'est pourquoi lors de cette étude, nous avons choisi de réaliser les différentes analyses (qPCR, histochimie et comportement) 1h après l'injection de corticostérone.

Suite à une injection quotidienne de corticostérone pendant 6 jours, nous observons une augmentation du niveau des transcrits des GR aussi bien au niveau de l'hypothalamus que du cervelet. Ces augmentations s'accompagnent d'une diminution des transcrits CRH-R1 au niveau de l'hypothalamus. Les variations d'expression de ces deux marqueurs, GR et CRH-R1, sont en adéquation avec les données de la littérature concernant l'activation de l'axe HHS et la boucle de rétrocontrôle négative exercée par la corticostérone. En effet, la stimulation par la corticostérone entraîne dans un premier temps une augmentation de l'expression de ces récepteurs. Ensuite, afin de ne pas avoir une hyperactivation de l'axe HHS qui entraînerait un emballement de la réponse au stress, la corticostérone régule cette activation en diminuant l'expression de la CRH et du CRH-R1. En effet, des études ont montré la présence d'un site de fixation pour les récepteurs aux glucocorticoïdes inhibant la transcription du gène (nGRE) au niveau du promoteur proximal de la CRH. La présence de site(s) nGRE a été mise en évidence aussi bien chez l'humain, que chez le rat et la souris (King et al., 2002; Malkoski et al., 1997; Przybycien-Szymanska et al., 2011). En plus de leur action inhibitrice sur la régulation de la CRH, les glucocorticoïdes régulent aussi négativement l'expression du CRH-R1. Huising et al en 2011 ont incubé à des temps différents des cellules d'ilôts pancréatiques humains et murins avec des glucocorticoïdes. Ils ont montré que le taux de transcrits CRH-R1 diminue de façon maximale 3h après le début de l'incubation avec les glucocorticoïdes et qu'à partir de 6h, le niveau des transcrits CRH-R1 revient à son état basal (Huising et al., 2011). Ceci pourrait expliquer que dans notre deuxième expérience, pour laquelle la mise à mort s'est faite environ 5h après la dernière injection de corticostérone, l'inhibition des transcrits CRH-R1 soit retrouvée uniquement dans l'hypothalamus. Au-delà de cet aspect, on ne peut ignorer l'effet possible de l'entraînement physique généré par les tests

comportementaux sur les variations des niveaux de transcrits entre les deux expériences.

Les variations d'expression des deux marqueurs, CRH-R1 et GR, sont donc de bons indicateurs de la fiabilité de notre modèle pour l'étude de la mise en place de régulations lors d'un stress.

En plus des variations des marqueurs CRH-R1 et GR dans l'hypothalamus, il s'avère qu'une exposition répétée à la corticostérone entraîne une diminution de l'expression du CRH-R1 au niveau du cervelet. Cette régulation peut s'expliquer par l'action de la corticostérone qui régule négativement l'expression de ce gène. Cette diminution d'expression du CRH-R1 est particulièrement intéressante car elle suggère un rôle potentiel du CRH-R1 et donc, de la CRH, au niveau du cervelet en condition de stress. Ces régulations transcriptionnelles s'accompagnent d'une diminution de l'activité métabolique au niveau de différentes régions du cerveau.

Il est connu qu'un excès de glucocorticoïdes, par apport exogène de corticostérone ou par induction d'un stress, altère la fonction mitochondriale et la production d'ATP en diminuant l'activité des complexes de la chaîne impliquée dans la phosphorylation oxydative (Fujita et al., 2009; Rezin et al., 2008). L'hypométabolisme régional que nous avons observé dans différentes structures de l'encéphale est en adéquation avec ces études et semble lié à la quantité de corticostérone administrée car les souris les plus affectées sont principalement celles qui ont reçu la plus forte dose (30 mg/kg).

La diminution de l'activité métabolique n'est pas globale mais atteint des régions spécifiques de l'encéphale : 1) elle se localise dans des structures impliquées notamment dans la réponse au stress comme le noyau PVN de l'hypothalamus (centre producteur de la CRH), le BST ou encore le noyau pré-optique médian ; 2) les ganglions de la base sont également affectés, non seulement au niveau des boucles motrices impliquant le cortex moteur (M1), le néostriatum dorsolatéral, la SN pars reticulata et les noyaux VL-VM du thalamus mais également au niveau de la boucle limbique, composée du cortex pré-limbique, du néostriatum ventral, du VP/SI, du noyau médiodorsal du thalamus et du cortex préfrontal ; 3) enfin, le cervelet et plus particulièrement les noyaux profonds ainsi que de nombreuses structures cibles comme le noyau rouge parvicellulaire, le noyau vestibulaire spinal ou encore le noyau VM du thalamus présentent un hypométabolisme régional suite aux injections répétées de corticostérone. Ces résultats confirment donc l'action directe des

glucocorticoïdes sur les structures nerveuses impliquées dans la régulation des fonctions motrices et plus particulièrement le cervelet, renforçant ainsi les résultats obtenus en qPCR.

L'étude comportementale que nous avons menée est originale dans le sens où elle a ciblé les fonctions motrices en évaluant non seulement l'activité motrice mais aussi l'équilibre, la posture, la coordination motrice et l'orientation spatiale. Elle a ainsi permis de tester si l'hypométabolisme régional mesuré dans de nombreuses structures motrices centrales avait un effet sur le comportement de la souris. L'exploration motrice et l'anxiété sont deux fonctions liées entre elles et les tests de l'actimètre, du labyrinthe en croix surélevé et d'émergence sont des tests appropriés pour les évaluer. Dans nos études, la cinétique et les doses de corticostérone utilisées n'ont pas modifié l'exploration motrice des animaux dans ces différents tests. La préservation de l'activité motrice est également observée dans les tests de la poutre et du labyrinthe aquatique où l'activité de nage était la même pour les trois groupes de souris. Sandi et al. en 1996 ont montré des déplacements et des activités stéréotypés plus importants dans le test de l'actimètre après une injection unique de corticostérone (Sandi et al., 1996) mais cet effet a été obtenu 7 à 15 min après injection et non après 1h, ce qui ressemble plus à une action non-génomique de la corticostérone (Hermans et al., 2014). De plus, nos résultats confirment les autres études basées sur des injections répétées de corticostérone chez le rat ou la souris qui rapportent, la présence ou non d'un comportement anxieux, mais toujours avec une activité locomotrice préservée, mesurée le plus souvent avec les tests de l'actimètre ou du labyrinthe aquatique (Demuyser et al., 2015; Gregus et al., 2005; Marks et al., 2009; Sousa et al., 2000; Yoon et al., 2014). Dans notre étude, nous n'avons pas trouvé de modification du comportement anxieux après administration de corticostérone. Ce résultat est similaire à celui obtenu dans le test du labyrinthe en croix surélevé pour des injections aigues de 20 et 40 mg/kg de corticostérone chez le rat (Lim et al., 2012). D'après les auteurs, il semblerait que l'administration de glucocorticoïdes exogènes n'induit pas de phénotype anxieux alors qu'un stress social ou un isolement soit susceptible de le déclencher (Demuyser et al., 2015; Kinsey et al., 2007; Yoon et al., 2014). Cependant, les effets anxiogènes de la corticostérone sont plus subtils car il semble exister une fenêtre de sensibilité à l'administration des glucocorticoïdes, vraisemblablement en rapport avec des modifications de la plasticité neuronale. Par exemple, une injection de

glucocorticoïdes au niveau de l'amygdale provoque un comportement anxieux, mesuré avec le test du labyrinthe en croix surélevé, 12 jours après injection alors que ce comportement n'apparaît pas le jour même de l'injection et ne se retrouve plus 18 jours après injection (Mitra and Sapolsky, 2008).

Le test du rotarod est le test qui a montré un déficit locomoteur important pour les souris traitées avec de la corticostérone (15 et 30 mg/kg). Ce test de comportement nécessite de l'équilibre, une coordination motrice et correspond à un apprentissage moteur or le cervelet est une structure qui joue un rôle essentiel dans cette tâche (Lalonde and Strazielle, 2007). L'absence de variation des performances intergroupes dans le test de la poutre témoigne d'un équilibre normal dans les groupes de souris traitées à la corticostérone. Les mauvaises performances dans le test du rotarod pourraient alors s'expliquer par une hypotonie musculaire. En effet, il a été montré que l'administration de glucocorticoïdes pouvait diminuer l'activité métabolique au niveau des muscles squelettiques (Duclos et al., 2001). Dans ce cas, le test du cintre, une version plus élaborée du test de suspension, devrait être affecté or, nous n'avons pas mis en évidence de chutes plus importantes parmi les souris ayant reçu de la corticostérone. Nos résultats corroborent donc ceux de l'équipe de Marks et al qui n'ont pas non plus observé de diminution des performances dans un test simple de suspension après injection chronique de corticostérone (Marks et al., 2009). Ainsi, le déficit obtenu dans le test du rotarod correspondrait d'avantage à une altération de la coordination motrice, tout comme dans le test du cintre, pour lequel le passage de la barre horizontale à la barre oblique nécessite une stratégie motrice basée sur une bonne coordination motrice. Cette stratégie nécessite la fonctionnalité du cervelet et du striatum. En effet ces troubles, dans les tests du rotarod et du cintre, ont déjà été observés après lésion du cortex cérébelleux ou des structures efférentes au cervelet comme les noyaux VM et VL ou CM du thalamus (Jeljeli et al., 2003).

Autre donnée de notre étude : nous n'avons pas observé de modification de l'apprentissage visuo-spatial qui est dépendant de la fonctionnalité de l'hippocampe mais aussi du cervelet. Les effets des injections de glucocorticoïdes sur l'apprentissage et la mémoire sont directement dépendants du type de stress : un stress aigu augmente le taux de glucocorticoïdes et stimule les fonctions cognitives et la mémorisation alors qu'un stress chronique induit des effets contraires sur ces fonctions aussi bien chez l'Homme que chez les Rongeurs (Wüppen et al., 2010). Il

est possible que notre protocole comprenant 6 jours d'injections quotidiennes suffise à altérer le système supprimant l'effet stimulant des glucocorticoïdes mais encore insuffisant pour provoquer des troubles cognitifs.

A présent, il nous semble important de préciser un point concernant la souche de souris (C57Bl/6J) utilisée lors de nos études. En effet, une étude récente visant à comparer l'effet d'injections de corticostérone sur les souches de souris C57Bl/6N et C57Bl/6J a montré que ces dernières semblent moins sensibles aux injections de corticostérone que les C57Bl/6N (Sturm et al., 2015). La souche de souris C57Bl/6J a été mise au point en 1920 par le laboratoire Jackson et la souche C57Bl/6N, mise au point par le NIH (National Institute of Health), dérive de cette première souche (Kiselycznyk and Holmes, 2011). Bien que ces deux souches de souris soient de même fond génétique, elles présentent certaines différences notamment génétiques (Mekada et al., 2009; Simon et al., 2013). Il s'avère aussi que les souris C57Bl/6N sont plus sensibles, notamment au stress, avec toutefois une moins bonne activité motrice (Matsuo, 2010).

Le choix des souris C57Bl/6J, qui ont de bonnes capacités locomotrices, nous a permis de mettre en évidence une altération de ces capacités suite à une exposition répétée à la corticostérone. Cette altération nous a particulièrement intéressé car dans les tests locomoteurs utilisés, notamment dans le test du rotarod, le cervelet joue un rôle très important. L'évaluation histochimique de l'activité métabolique réalisée après l'étude comportementale nous a donnée des résultats inattendus puisque nous n'avons pas retrouvé l'hypométabolisme régional déterminé par un excès de glucocorticoïdes. Il semblerait donc que l'entraînement physique et/ou la soumission de l'animal à des environnements nouveaux stimulent les boucles de régulations compensatoires en réaction à un excès de glucocorticoïdes. Il est aussi possible mais moins probable que ces régions subissent un stress oxydatif et que l'excitotoxicité glutamatergique affecte la fonction mitochondriale, supprimant ainsi l'effet dépressif induit par la corticostérone. La persistance de l'hypométabolisme dans deux régions motrices, le néostriatum moteur et le noyau VM du thalamus en lien direct avec le cervelet, peut expliquer à lui seul les défauts de coordination motrice observés dans les tests du rotatod et du cintre (Jeljeli et al., 2003).

Ces altérations locomotrices associées à une baisse du niveau de transcrits du CRH-R1 au niveau du cervelet suggèrent que la CRH, via le CRH-R1, pourrait jouer un rôle important dans la régulation des fonctions de coordination locomotrice. En effet,

bien que les glucocorticoïdes injectés puissent être à l'origine de ces altérations motrices, les variations d'expression du CRH-R1 observées au niveau du cervelet pourraient indiquer un rôle de ce récepteur dans ces fonctions motrices. Il se pourrait donc qu'en plus de l'action des glucocorticoïdes, la CRH puisse également jouer un rôle dans l'altération des capacités de coordination locomotrice en se fixant au CRH-R1. Avec cette seconde expérience, nos résultats ne nous permettaient donc pas de définir précisément le rôle du CRH-R1 au niveau du cervelet en conditions de stress. C'est pourquoi il nous a paru important de poursuivre ces études afin de définir un peu plus précisément le rôle potentiel du CRH-R1 au niveau de la régulation de ces fonctions locomotrices, notamment au niveau du cervelet, en conditions de stress. C'est pourquoi, pour la suite de ce projet, nous avons décidé de réaliser une nouvelle expérience en inhibant spécifiquement l'activité du CRH-R1 pour voir si son inactivation influait sur les altérations observées précédemment.

Article en cours de soumission

Exposure to corticosterone alters CRH-R1 expression in the cerebellum and motor behavior in mice.

Guillaume Harlé^a, Robert Lalonde^b, Coralie Fonte^a, Armelle Ropars^a, Jean-Pol Fripiat^a, Catherine Strazielle^{a,c,d*}

^a EA7300, Lab. « Stress, Immunity, Pathogens », Lorraine University, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

^b EA4699, Lab. ICONES, University of Rouen, 76821, Mont-Saint-Aignan, France

^c Service of Microscopy, Lorraine University, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

^d CHU de Nancy, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Corresponding author at : Laboratoire « Stress, Immunité, Pathogènes » (EA7300) Faculté de Médecine, Bâtiment A/B, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy.

Tel : +33 (3) 83 68 36 13

E-mail address : catherine.strazielle@univ-lorraine.fr (C. Strazielle)

E-mail addresses:

guillaume.harle@univ-lorraine.fr (G. Harlé)

robert.lalonde@univ-rouen.fr (R. Lalonde)

coralie.fonte@univ-lorraine.fr (C. Fonte)

armelle.ropars@univ-lorraine.fr (A. Ropars)

jean-pol.fripiat@univ-lorraine.fr (J.-P. Fripiat)

Summary

Receptors for glucocorticoid (GR) and corticotropin-releasing hormone (CRH) are largely found in brain sensorimotor structures particularly in cerebellum, underlining a potential role of the stress hormones in regulation of motricity. Repeated injections in mice with two doses of corticosterone (15 and 30 mg/kg) were used to evaluate the status of hormonal expression in cerebellum, hippocampus and hypothalamus in undisturbed housing conditions (experiment 1) or after subjecting different behavioral motor tests (experiment 2). In both experiments, metabolic activity in numerous brain regions involved in motor functions and emotion was measured by means of cytochrome oxidase (COX) activity labelling. One hour after the corticosterone administration, CRH-R1 transcription was downregulated in hypothalamic and cerebellar regions and hypometabolic changes were observed for mice treated with the higher corticosterone dose in several brain regions of the limbic system and sensorimotor circuitries such as the frontal cortices, basal ganglia, deep cerebellar nuclei, and the red nucleus. In the second experiment, corticosterone injections did not modify motor activity, anxiety, and spatial orientation but altered specifically motor coordination in the rotorod, and with a less degree in the coat-hanger test. In association, cerebellum was sensitive to corticosterone injections in the form of upregulated GR transcription. In these mice, COX activities were similar to control mice except in ventromedial thalamus and dorsal neostriatum as if the physical activity induced by the motor tasks had protected brain energy metabolism against stress. The present findings demonstrated a functional interaction between corticosterone and CRH/CRH-R1 system played by the cerebellum in motor control.

KEYWORDS

Glucocorticoids;

Corticotropin Releasing Hormone;

Motor coordination;

Cognitive function;

Brain metabolic activity

1. Introduction

Glucocorticoids such as corticosterone (CORT) in rodents or cortisol in humans, are the resulting products of the adrenal gland cortex in response to activation by stress of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis from paraventricular nucleus corticotropin releasing hormone (CRH) secretory cells (Herman and Cullinan, 1997). To avoid glucocorticoid excess, the HPA axis is under the influence of several regulation circuitries. Negative feedback control by glucocorticoids themselves and by CRH acts on secretory cells of the hypothalamus and pituitary gland (Herman and Cullinan, 1997). Another regulation involves expression and activity of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases (11 β -HSD) 1 and 2, two antagonist enzymes producing or inhibiting active or inactive forms of glucocorticoids (Seckl and Walker, 2004). Catecholaminergic inputs and limbic neurocircuits, including the medial prefrontal cortex, hippocampus, and amygdala, also modulate the HPA axis (Herman and Cullinan, 1997; Pecoraro and Dallman, 2010).

Limbic structures are vulnerable to stress because of elevated densities in glucocorticoid receptors (GR, Morimoto et al., 1996). Anxious behavior appeared after a single dose of CORT (Mitra and Sapolsky, 2008; Espallergues et al., 2012) while an anxio-depressive phenotype occurred after chronic administration (Gregus et al., 2005; Johnson et al., 2006; Zhao et al., 2009). Neuroplastic alterations (Sousa et al., 2000; Kott et al., 2016), oxidative damage (Tagliari et al., 2010), and tissue atrophy (Zhang et al., 2006) in the hippocampus were observed under stressful conditions, associated with cognitive impairments following an inverted U-shape dose-response relationship (Lupien and McEwen, 1997 for review).

Motor functions are not spared by stress (Metz, 2007). High GR densities are present in sensorimotor cortex, basal ganglia, and cerebellum (Morimoto et al., 1996) and some studies reported stress-induced alterations in locomotor activity, postural adjustments, and motor coordination (Sandi et al., 1996; Metz et al., 2001; Lepicard et al., 2003; Metz, 2007 for review). In cerebellar cortex, GRs are localized on granule and Purkinje cells (Morimoto et al., 1996), the latter being particularly vulnerable to oxidative damage. Chronic mild stress in rats inhibited mitochondrial oxidative phosphorylation in cerebral cortex and cerebellum

(Rezin et al., 2008). Cerebellar atrophy associated with deficits on a rotating bar was observed in adult mice after CORT administration during infancy (Howard and Granoff, 1968).

CRH is another important regulator of stress responses. Besides the hormonal axis, the neuropeptide acts as a neuromodulator via CRH-R1 and CRH-R2 receptors, with an approximate 13-fold higher affinity for the former. They are widely diffused in brain, especially the hippocampus and cerebellum where expression levels are high (Bishop et al., 2000; Reul and Holsboer, 2002). Mice deficient for *Crhr1* developed locomotor alterations not compensated by CRH injections, whereas acute CRH injections induced locomotor activation in the wild-type (Contarino et al., 2000). Moreover, *Crh* overexpressing mice were impaired on the rotorod test for motor coordination (Van Gaalen et al., 2002) and displayed regional atrophy, especially in the cerebellum (Goebel et al., 2010).

We aimed to study the impact of CORT on the CRH/CRH-R1 system, especially in the cerebellum and different motor functions evaluated in a battery of tests. The first experiment concerned the status of hormonal expression one hour after CORT injection in normal mice. In the second experiment, the same protocol of CORT injections was followed by behavioral tests. In both experiments, metabolic activity in numerous brain regions involved in motor functions and emotion was measured by means of cytochrome oxidase (COX) activity labelling. COX is a mitochondrial enzyme involved in the respiratory chain leading to ATP production and a reliable marker of neuronal activity (Wong-Riley, 1989). This type of cartography has all the more interest in that glucocorticoids can inhibit metabolic activity as shown by COX labeling, especially in CNS and muscle (Bennett et al., 1996; Duclos et al., 2001).

2. Materials and methods

2.1. Animals and drug administration

C57Bl/6J male mice (Charles River, L'Arbresles, France), controlled for age (14-18 weeks), were housed 3 per cage and maintained under a 12/12-h light-dark cycle with free access to

food and water. Corticosterone (Tocris Bioscience, R&D system, France), dissolved in 0.9% NaCl with 100mM DMSO as the control vehicle, was administered i.p. with an injection volume of 5mL/kg at doses of 15 (low-dose) and 30 (high-dose) mg/kg between 13:00 and 14:00h. Two experiments were conducted according the protocol described on Fig1. *In experiment 1*, the drugs were injected to three groups of mice (control vehicle, low-dose CORT-treated, and high-dose CORT-treated, n=7/group) during 6 consecutive days. On the last day, the mice were killed 1 hour after drug administration. *In experiment 2*, the three groups of mice (n=10/group) were injected in the same manner and assessed on behavioral tests 1 hour after the injection following the chronological pattern presented in Fig. 1. On the last day, the mice were killed at the end of the test. The research protocol adhered to guidelines of the European Council Directive (2010/63/UE) and animal care regulations in force at the Ethical Committee of the University of Lorraine (CELMEA-2012-0008).

2.2. Behavioral tests

The tests were performed according to protocols described in Lalonde et al. (2008). In the three exploratory tests, the apparatus was wiped clean with a damp cloth and dried between entry of each animal.

Exploration activity tests (1st week - days 1 to 3)

The photocell activity chamber (Letica model LE8811, Bioseb, France), an automatic version of the open-field, contained a black Perspex floor, 45cm × 45cm in size and with 36-cm high transparent Perspex walls. The device distinguished between fast (>10cm/s) and slow (<10cm/s) ambulatory, stereotyped, and rearing movements, recorded by two horizontal rows of infrared photocell detectors at a height of 1 and 1.5cm and an intercell distance of 2.5cm. The mice were placed in the center of the apparatus and the number of movements measured in a single 5-min session. *The elevated plus-maze* (Letica model LE 840, Bioseb, France) consisted of four cross-shaped arms (length: 45cm, width: 10cm, height from floor: 68cm) and a 10cm × 10cm central region with a floor made of black Perspex. Two arms were enclosed by 9cm high transparent Perspex walls while the other two contained no wall. The mice were introduced in the central region, considered as enclosed time until an open arm

was entered, and observed during a single 5-min session. Entries (4-paw criterion) and time spent in enclosed and open arms were measured, together with open/total arm entries and duration ratios. In *the emergence test*, the mice were placed inside a novel small toy object (orange-colored plastic shoe, length: 13cm, width: 6cm, height: 7.5cm) perforated with three holes (diameter: 3cm) and situated in the middle of a 41cm × 27cm enclosure made of white plastic and surrounded by 18cm high walls. Latencies before emerging to this enclosed field with two or four paws in contact with the floor were determined in two 5-min trials with an intertrial interval of 90min. Irrespective of whether emergence occurred or not, the mice were allowed to explore the large enclosure for 10s.

Motor coordination tests (2nd week - days 1 to 3)

In the stationary beam test, the mice were placed in the center of a round wooden beam (diameter: 2cm), covered with adhesive tape, divided into 11 segments of 10cm, and situated at a height of 70cm from a mat-covered floor to cushion any fall. The number of crossed segments (4-paw criterion) and latencies before falling were measured in a single 4-trial session with a 1min cut-off period and a 30min intertrial interval. *In the coat-hanger test*, the mice were placed upside-down in the middle of a horizontal wire (diameter: 2mm; length: 41cm) situated at a height of 60cm from the mat-covered floor. The mice were released only after firmly gripping the bar with all four paws. Seven types of movement times (MT) were compiled: latency before reaching (snout criterion) the first 10cm segment (MT-1) or the extremity (MT-2) of the horizontal bar, latency before reaching one of the two diagonal bars with two, three, or four paws (respectively, MT-3, MT-4, and MT-5) as well as latency before reaching the midway (MT-6) or the top (MT-7) of either diagonal bar. The latency before falling off and the number of falls were also recorded. In addition, the number of successful reaches (for 4 trials, a sum from 0 to 4) was scored for each MT. Whenever a mouse reached the top portion of the diagonal bar, it was immediately retrieved and a score of 60s given for latency before falling. Whenever a mouse fell, a score of 60s was given for all MTs not attained. The mice were observed during a single 4-trial session with a 1min cut-off period and a 30min intertrial interval. *The rotorod* (Letica Rota-Rod/RS, Bioseb, France)

consisted of a beam made of striated white Perspex (diameter: 3cm, width: 5cm; height: 17cm), providing a firm grip, and flanked at both ends by round plates for preventing escapes. The mice were placed on top of the revolving beam at an initial speed of 4rpm. The rotorod gradually accelerated from 4 to 40rpm in smooth graduated steps over a 2min trial. The latency before falling was measured in a single 8-trial session with a 20min intertrial interval. When the mice rotated passively for two complete turns, their trial was counted as a fall.

Spatial learning (3rd week - days 1 to 6)

The Morris water maze consisted of a basin (diameter: 86cm, wall height: 30cm) made of plastic and filled with water (22°C) at a height of 21cm. Yellow plastic beads were evenly spread over the water surface to mask the location of the escape platform (diameter: 8cm) made of plastic and covered with a wire mesh grid to ensure a firm grip. The pool was contained in a room with several extra-maze visual cues. The mice were placed next to and facing the wall successively in north (N), east (E), south (S), and west (W) positions, with the escape platform hidden 1cm beneath water level in the middle of the NW quadrant. The experimenter, hidden from the view of the animals, was able to follow their swimming trajectories on a video-monitor, on which the pool was divided into four equally spaced quadrants. Quadrant entries (four-paw criterion) and escape latencies were measured in 4-trial sessions for 5 days (days 1 to 5) with a 30min intertrial interval. The mice remained on the platform for at least 5s; whenever they failed to reach the escape platform within the 1min cut-off period, they were retrieved from the pool and placed on it for 5s. After their swim, the mice were kept dry in a plastic holding cage filled with paper towels. The day after the acquisition phase (day 6), a probe trial was conducted by removing the platform and placing the mouse next to and facing the N side. The time spent in the previously correct quadrant was measured in a single 1-min trial. Two hours later, the visible platform version was evaluated, with the escape platform lifted 1cm above water level and shifted to the SE quadrant. A pole (height: 7cm) was inserted on top of the escape platform as a viewing aid. In an identical manner to the place learning task, quadrant entries and escape latencies were

measured for 4 trials per session, the animals stayed on the platform for 5s, and a 1-min cut-off period was imposed with a 20-min intertrial interval, except that the test was conducted in a single day.

2.3. Tissue collections

Each mouse was killed with halothane, blood rapidly collected by cardiac puncture, then the brain removed after decapitation. The brain was cut along the median sagittal plan into two halves: the right hemi-encephalon was snap-frozen in cooled 2-methylbutane for histochemical analyses and the left was thawed on a cold plate for microdissection of the hypothalamic region (preoptic area, hypothalamic nuclei, and mammillary body) and hippocampal formation (anterior and posterior Ammons' horn and dentate gyrus); the half cerebellum was taken whole. The blood was centrifuged at 5000g for 15min at 4°C. Sera as well as brain samples were stored at -80°C until further use.

2.4. Serum corticosterone assay

Serum corticosterone levels were measured, in duplicate by means of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit, Arbor Assays, Euromedex, France) according to the manufacturer's instructions. Corticosterone was calculated from a standard curve and expressed in ng/mL. The intra-assay and inter-assay coefficient variations were respectively below 10% and 6%.

2.5. Cytochrome oxidase histochemistry

Brain cartography of regional metabolic activity was assessed by COX labeling on series of 20µm-thick coronal frozen sections (from the right hemi-encephalon) and standards (sections of brain homogenates of 10, 20, 30, and 40µm in thickness) according to a quantitative histochemical method described in detail by Strazielle et al. (1998). The incubation time was 40min. Control sections, by adding 0.01M potassium cyanide to the incubation medium, remained unstained. Under experimental conditions, COX staining intensity was proportional to the thickness of the standard sections (linear function with $r=+0.999$). Images of the labeled structures, identified by means of the mouse brain stereotaxic atlas (Franklin and Paxinos, 1997), were collected on a light microscope with a 4x objective and a digital camera

(Olympus, France) for quantitative densitometric analysis using ImageJ version 1.37v software from the National Institutes of Health. A standard curve was generated from a Kodak grey-scale, allowing transformations of grey levels into optical density units. For each region, COX labeling was measured by multiple readings.

2.6. RNA extraction and quantitative real-time PCR (RTqPCR)

Total RNAs were extracted from hypothalamic, hippocampal, and cerebellar samples with TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). After DNase treatment (Fermentas, Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France), 1µg of total RNA was reverse transcribed with random primers, dNTP, RNaseOUT and M-MLV reverse transcriptase following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Cergy- Pontoise, France) in a final volume of 100µL. Quantitative real-time PCR (RTqPCR) was conducted with a Mastercycler realplex² real-time PCR machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) as follows: 95°C for 3min, then 40 cycles of 95°C for 15sec, and annealing temperature for 30sec. Each qPCR mix contained 7.5µL of mesaFast SYBR master mix (Eurogentec, Angers, France), 1.5µL of forward primer and reverse primer at 1µM (table 1), 3µL of ultrapure water and 1.5µL of cDNA. For each RTqPCR, melting curves were processed from 50 to 95°C to check the quality of the amplification. Relative expression of NR3C1, CRH, CRH-R1, 11b-HSD1, and 11b-HSD2 transcripts were normalized to 3 housekeeping transcripts (Ppia, Eef2 and Eif3f) whose stability was checked with Bestkeeper software (Pfaffl et al., 2004). Samples were run in duplicate/plate and plates were repeated twice.

2.7 Statistical analyses

For all experiments, homogeneity of variances and normality of distribution were controlled with Levene and Kolmogorov-Smirnov tests, respectively. For *behavioral testing*, *RTqPCR*, and *CORT level measures*, intergroup differences were estimated by analysis of variances (ANOVAs or Kruskal-Wallis tests) followed by pairwise comparisons (PLSD Fisher or Mann-Whitney tests) and the statistical significance level was set at p=0.05. A two-way ANOVA test with repeated measures was used for the *rotorod and Morris maze*. In the *probe test*, each group was compared by the Mann-Whitney *U*-test to a theoretical group performing at

chance (25%) with zero variance. *COX data* were first analyzed by a series of two-way ANOVAs (drug versus specific brain regions) according to anatomically defined pathways. Intergroup comparisons were then evaluated with two-tailed unpaired *t*-tests and the level of significance raised at $p=0.01$ in regard to the high number of regions studied.

3. Results

For both experiments, CORT-treated mice did not differ from controls for body weight at either the first or the final day of the experiments ($p>0.05$, data not shown). In experiment 1, the control group body weight increased by 1g while it was unchanged in the two other groups. In experiment 2, body weight increased by 0.4 g for the three groups.

3.1 Experiment 1 (without behavioral tests)

Serum CORT levels showed an intergroup difference ($F(2)=9.8$, $p<0.01$), low-dose ($356\pm 55\text{ng/mL}$) and high-dose ($406\pm 25\text{ng/mL}$) CORT-treated mice with approximately 6 and 7 times higher levels than controls ($59\pm 14\text{ng/mL}$).

RTqPCR results: While expression of NR3C1 (GR) and CRH mRNAs was equivalent in the structures of the three mouse groups ($p>0.05$, Fig. 2A,C), CRH-R1 mRNA was down-regulated in hypothalamic and cerebellar regions ($H(2)=6.1$ and $H(2)=6.8$, respectively; $p<0.05$), lower by 33% in the hypothalamic region of high-dose CORT-treated mice and lower by 32% in the cerebellum of both CORT groups relative to controls (Fig. 2B). 11b-HSD1 and 11b-HSD2 mRNA expression was unchanged ($p>0.05$; Fig. 3A-B).

With respect to *COX activity*, repeated CORT administration induced only hypometabolic changes in various brain regions (Table 2). A global measurement of labelling revealed decreased COX activity in frontal cortices ($F(2,39)=4.3$; $p<0.05$), mainly due to the primary motor region ($p<0.01$), though reaching borderline significance in eye field and prelimbic regions of high-dose CORT-treated mice relative to controls. In the basal ganglia, COX activity was lower in the neostriatum ($F(2,42)=4.0$; $p<0.05$), predominantly dorsolateral and dorsomedial parts ($p<0.01$) as well as ventral pallidum ($p<0.001$) of high-dose CORT-treated mice. An interaction occurred between treatment and mesencephalic regions ($F(4,32)=3.0$;

$p < 0.05$), affecting the substantia nigra pars reticulata ($p = 0.016$) of high-dose CORT-treated mice. In the limbic system, although the amygdala was spared, the hippocampal complex was hypometabolic in its posterior part ($F(2,176) = 4.0$; $p < 0.05$), affecting more particularly the radiatum layer of the CA1 region ($p < 0.01$), the posterior subiculum as well as the entorhinal cortex ($p < 0.01$) for the CORT high-dose group. In addition, forebrain cholinergic regions were hypometabolic ($F(2,15) = 11.6$; $p < 0.05$) with the bed nucleus of the stria terminalis at borderline significance. In the diencephalon, the thalamus was affected ($F(2,75) = 6.3$; $p < 0.01$), as COX activity decreased in mediodorsal and ventromedial nuclei ($p < 0.01$) of the CORT high-dose group, also at borderline significance for laterodorsal, ventroposterior, and centromedial-centrolateral nuclei. The medial habenula also displayed lower metabolic activity ($p < 0.01$). In the hypothalamus ($F(2,56) = 4.1$; $p < 0.05$), hypometabolic regions were found in the medial preoptic area with borderline significance of the high-dose group. In the cerebellum, while COX activity was unchanged in the cortex ($p > 0.01$), a high-dose CORT effect was detected in the deep cerebellar nuclei ($F(2,28) = 8.2$; $p < 0.05$) with a predominance in fastigial ($p < 0.01$) and interpositus ($p < 0.001$) nuclei, the dentate nucleus lying just below significance ($p = 0.04$). Among brainstem regions, some regions such as the dorsal raphe, medial vestibular, medial pontine, and reticular nuclei displayed moderate metabolic changes but without reaching the required level of statistical significance. The red nucleus was the only cerebellar efferent region significantly affected by CORT administration ($F(2,16) = 3.9$; $p < 0.05$) with a predominant effect in its parvicellular part ($p < 0.01$) for both low- and high-dose CORT-treated mice. The last metabolic change occurred in the C1 noradrenergic region ($p < 0.001$) of the CORT high-dose group.

3.2 Experiment 2 (with behavioral tests)

Behavioral performances: Exploratory activity measured in open-field, elevated plus-maze, and emergence tests remained unchanged ($p > 0.05$; Fig. 4A). In motor coordination tests, CORT-treated mice did not differ from controls on the stationary beam ($p > 0.05$; Fig. 4A), but a group effect was found for latencies before falling ($F(2,27) = 7.3$; $p < 0.01$) on the rotarod (Fig. 4B), both experimental groups falling faster than controls ($p < 0.01$). The trial effect was also

significant ($F(3,6)= 11.7$; $p<0.0001$) as the result of improved performances with training. In the coat-hanger task (Fig. 4A and 4C), CORT administration affected successful reaches on the diagonal bar ($F(2,27)=3.6$; $p<0.04$), the high-dose concentration lowering performances ($p=0.013$) for MT-4 and MT-5. In the Morris water maze (Fig. 4A), acquisition was unchanged among mouse groups ($p>0.05$ for group effect), although the day effect was significant for quadrant entries ($F(4,8)=23.1$; $p<0.0001$) and escape latencies ($F(4,8)=16.3$; $p<0.0001$), attesting to the progressive improvement in performances. There was no intergroup difference in the probe test ($p>0.05$, with 21.3 ± 2.8 s, 19.4 ± 2.8 s, and 15.5 ± 1.7 s, respectively for controls, low-dose CORT-treated mice, and high-dose CORT-treated mice). The visible platform test was not affected either ($p>0.05$, data not shown).

In experiment 2, *serum CORT levels* were about 6 times higher in the control group than in the previous experiment, presumably as the result of behavioral testing, so that no intergroup difference occurred ($p>0.05$, 364 ± 30 , 367 ± 25 , and 315 ± 31 ng/mL, respectively for controls, low-dose CORT-treated mice, and high-dose CORT-treated mice).

RTqPCR results: CORT-related changes of NR3C1 mRNA levels (Fig. 2A) were found in the hypothalamus and cerebellum: low- and high-dose CORT-treated mice expressed respectively 17% and 19% higher transcript levels in the hypothalamus ($H(2)=8.8$; $p<0.05$), while in cerebellum ($H(2)=13.2$; $p<0.01$), NR3C1 mRNA levels were higher only for high-dose CORT-treated mice when compared with either control (+48%) or low-dose CORT-treated (+44%) mice. In an opposite fashion, CRH-R1 mRNA levels (Fig. 2B) were down-regulated in the hypothalamus ($H(2)=12.7$; $p<0.01$) at 30% and 38% respectively for low- and high-dose CORT-treated mice. In the hippocampus, the CRH mRNA expression was altered at the significance threshold ($H(2)=5.8$; $p=0.054$), with 38% and 40% decreases respectively, in low-dose and high-dose CORT-treated mice (Fig. 2C). Considering the enzymes, 11b-HSD1 mRNA expression was altered in the cerebellum ($H(2)=7.0$; $p<0.05$) being respectively 35% and 40% higher in low- and high-dose CORT-treated mice (Fig. 3A). On the contrary, the expression of 11b-HSD2 mRNA remained unchanged in the three regions studied (Fig. 3B).

COX activity was preserved in most brain structures measured except the dorsal striatum ($F(2,50)=5$; $p<0.05$) and thalamus ($F(10,100)=3.3$; $p<0.01$ for interaction). The dorsomedial striatum was significantly lower (-12%) in the high-dose CORT group and the interaction between treatment and thalamus affected particularly ventromedial nuclei with lower metabolic activity in low-dose (-11%, $p=0.011$) and high-dose (-13%, $p<0.01$) CORT-treated mice when compared with controls.

4. Discussion

Exogenous CORT administration is a well-established method to mimic stress exposure by increasing circulating levels of glucocorticoids in animals (Gregus et al., 2005; Kott et al., 2016). In the first two weeks of the present study, CORT was injected daily in mice for 3 days and three exploratory or motor tests designed to be evaluated in 3 different orders to control for possible order effects. During the final week, CORT was daily injected for 6 days in all groups and so a cumulative effect may have occurred. Zhao et al. (2009) showed that 6-day CORT injections at a dose of 20mg/kg caused an anti-depressant effect, while 18-day or 36-day CORT administration increased depression-like behavior in male mice. Similarly, daily 20mg/kg CORT administration for 10 days (Brotto et al., 2001) was not sufficient to induce depression-like behavior in mice. In our final week of testing, Morris water maze performances as well as measures of brain regional metabolism and molecular neurochemistry reflect short-term CORT administration.

Body weight: several studies (Gregus et al., 2005; Marks et al., 2009) have shown lower body weight gains under chronic CORT depending on dose and number of injections (Johnson et al., 2006). Body weight decreased as early as day 6 in rats receiving daily a CORT dose of 40mg/kg (Kott et al., 2016). But in the present study, no evident body weight change was observed, possibly because of the mouse strain used or the nature of the behavioral tasks. Body weight was similarly unchanged in rats under swim stress for two weeks (Metz et al., 2001).

4.1. Serum corticosterone levels and regional gene expression

A CORT injection paradigm generally elevates serum CORT levels within two hours. Serum levels measured in CORT-treated mice in experiment 1 reflect exogenous administration still present in the vascular compartment and mimic stress. In experiment 2, the mice were killed five hours after CORT injections, a time sufficient to eliminate the exogenous hormone from the vascular compartment. The elevated CORT serum levels even in the control group were probably caused by the stressful nature of the Morris water maze task. Of note is that despite daily repeated CORT administration, HPA axis regulation appeared preserved in response to the stressful procedure. Up-regulation of GR mRNA expression associated with down-regulation of CRH-R1 mRNA expression in the hypothalamus of CORT-treated mice indicate feedback control of the HPA axis, illustrating balanced regulation of CRH neurons between the two types of receptors. In experiment 1, CORT treatment also decreased hypothalamic CRH-R1 gene transcription but without affecting GR mRNA expression, possibly due to a different level of neural modulation (Herman and Cullinan, 1997) or the ratio of expression between mineralocorticoid receptors and GRs co-localized in CRH neurons of the hypothalamus (Han et al., 2005). The unchanged CRH-R1 mRNA expression after low-dose CORT treatment may indicate lesser GR activation in mice in undisturbed housing conditions than mice subject to behavioral tasks.

Besides hypothalamic alterations, CRH mRNA expression was down-regulated in the hippocampus of CORT-treated behaving mice. CRH acts as a neurotransmitter in the hippocampus and plays a role in neurogenesis and synaptic plasticity (Sousa et al., 2000), glutamate release, and long-term potentiation (Chen et al., 2012). Since high CORT concentrations cause oxidative damage (Tagliari et al., 2010), lower CRH mRNA levels could reflect negative feedback control or a local detrimental impact of CORT administration associated with glutamate-related neurotoxicity (Wizlowska-Stanek et al., 2016), a hypothesis to be verified at a later date by examining the neuronal integrity of this region.

The cerebellum was also sensitive to CORT injections, in the form of up-regulated expression in GR mRNA and 11b-HSD1 mRNA conjugated to unchanged 11b-HSD2 mRNA levels favoring the active form of CORT for behavior-tested mice. Moreover, cerebellar CRH-

R1 mRNA levels diminished one hour after CORT injections and thus represent an effect on local CRH/CRH-R1 functions. CRH-R1 mRNA is normally present in granule and Purkinje cell layers (Bishop et al., 2000) receiving respectively CRH stimulation from mossy and climbing fibers. CRH indirectly stimulates Purkinje cell firing rate by affecting excitatory afferents and inhibits GABAergic inputs, thus playing a role in the induction of long-term depression (Bishop and King, 2013) and neuroplasticity. Moreover, an acute restraint stress increased dendritic spines of Purkinje cells (Gounko et al., 2013). The CORT effects on CRH/CRH-R1 may be responsible for alterations in two of our sensorimotor tests (see section 4.3).

4.2. Brain metabolic alterations in response to corticosterone administration

Glucocorticoids induce mitochondrial changes, partly via oxidative stress (Madrigal et al., 2001; Zhang et al., 2006) and in particular disrupt brain glucose metabolism (Detka et al., 2015). Chronic stress or CORT infusion reduced COX activity in total brain and more specific regions (Bennett et al., 1996; Rezin et al., 2008; Liu and Zhou, 2012). In the present study, CORT administration caused only hypometabolism in specific brain regions seemingly in a dose-dependent manner. Regions such as the medial septum, dorsal raphe, or hypothalamic paraventricular nucleus presented intergroup differences of over 13% without reaching significance, because of their median position, some tissue being lost during sagittal cutting. As expected, alterations targeted areas rich in GRs. However, COX activity was spared in amygdala, despite its elevated GR density (Morimoto et al., 1996). Contrariwise, some structures with weak receptor density such as the substantia inominata or deep cerebellar nuclei (Morimoto et al., 1996) had diminished COX activity relative to control. Thus, regional interactions and oxidative stress generation (Tagliari et al., 2010) are possible additional factors of the metabolic deficits.

Alterations mainly concerned areas involved in stress regulation but also motor control systems in neocortex, basal ganglia, and cerebellum. Several regions of motor and limbic cortical loops within the striatum were affected, the limbic one participating in emotional and motivational aspects of motor behavior (Graybiel, 1995). Moreover, the hypometabolism

found in deep cerebellar nuclei and their target regions such as spinal vestibular, red, and ventromedial thalamic nuclei, is another indication of the impact of glucocorticoids on cerebellar circuitry (Rezin et al., 2008).

In experiment 2, COX activities in CORT-treated mice were surprisingly similar to controls except for two regions, as if behavioral testing had annihilated the negative effect of the hormone on energy metabolism. Physical exercise was shown to activate mitochondrial function and protect brain energy metabolism against stress (Liu and Zhou, 2012). CORT treatment simulated a single feedforward aspect on the HPA axis, namely GR activation. The lower regional metabolic activity obtained in experiment 1 illustrates the direct impact of the glucocorticoid on brain metabolism. However, stress normally involves biogenic amine and cholinergic responses able to potentiate or modulate regional brain reactions to stress (Herman and Cullinan, 1997; Espallergues et al., 2012). The results observed in behaving mice may illustrate such regulations, at least in the present conditions when the duration of CORT treatment still permits homeostatic responses.

4.3. Behavioral alterations in response to corticosterone administration

Since GRs are expressed in sensorimotor regions of the brain (Morimoto et al., 1996), both stress and elevated glucocorticoid levels have an impact on motor functions responsible for postural adjustments (Lepicard et al., 2003) and skilled movements (Metz et al., 2001). The behavioral expertise of our study targeted functions regarding ambulation, equilibrium, posture, and coordination as well visuomotor control while swimming. Motor activity and anxiety are interdependent, so that open-field, elevated plus-maze, and emergence tests seemed the most appropriate for evaluating both. CORT administration did not alter exploratory activity when compared with controls. Likewise, CORT administration had no effect on motor coordination in the stationary beam and spatial orientation or visuomotor control in the water maze. Sandi et al. (1996) observed higher horizontal and stereotyped activities in the open-field after a single CORT administration, but this effect was obtained at the 7.5- or 15min, not the 60min post-injection interval, attesting to a non-genomic action. Therefore, our 60min post-injection delay may be sufficient to explain unchanged motor

activity. Moreover, chronic CORT injections in rats and mice sometimes show changes in anxiety but often with no change in the open-field (Gregus et al., 2005; Marks et al., 2009; Yoon et al., 2014; Demuyser et al., 2016) or the Morris water maze (Sousa et al., 2000). In our paradigm, anxiety was also unaffected in CORT-treated mice. According to Yoon et al. (2014), studies demonstrating anxiety-related phenotypes to CORT are induced by social stressors (Demuyser et al., 2016) rather than by peripheral administration. However, results are variable. While acute 0.5mg/kg CORT decreased open arm entries and duration in C57BL/6 mice (Espallergues et al., 2012) and acute 10mg/kg CORT did the same in rats but only after a post-injection interval of 12 days (Mitra and Sapolsky, 2008), no maze effect occurred after acute 20 or 40mg/kg corticosterone in rats (Lim et al., 2012). Our negative results at 15 and 30mg/kg agree with the latter study.

The sole behavioral effects of CORT administration were to impair sensorimotor abilities on the rotorod and to a lesser degree the coat-hanger at the higher dose. These tasks depend at least in part on cerebellar circuitry (Lalonde and Strazielle, 2007), requiring muscle strength, postural adjustments for the maintenance of balance, and coordination, with particular involvement of sensorimotor learning on the rotorod. Hypotonic muscles might participate in these sensorimotor deficits, since muscle mitochondrial metabolism seems to be related to plasma CORT variations (Duclos et al., 2001). However, grip strength was higher in stressed relative to non-stressed rats (Metz et al., 2001) and neither wire suspension (Marks et al., 2009) nor coat-hanger tests showed an effect on falls or falling latencies, indicating relative preservation of muscle tonicity. The unaltered performance on the stationary beam also argues in favor of normal balance. The lower motor performances favor instead a deficit in motor coordination, shown in reduced rotorod falling latencies and more limited coat-hanger reaches. The up-regulation of cerebellar GR mRNA expression in CORT-treated mice suggests that the steroid action on granule and Purkinje cells (Morimoto et al., 1996) plays a direct role on motor impairment or an indirect one possibly by acting on the CRH system. Disability on a slowly rotating bar was observed in association with cerebellar atrophy in adult mice after chronic CORT administration during infancy (Howard

and Granoff, 1968). The performance alterations on the rotorod displayed by CRH overexpressing mice (Van Gaalen et al., 2002) or after CRH antagonist injection in the cerebellar nuclei (Bishop and King, 2013) corroborate the role of CRH on CORT administration. Similar motor coordination deficits were observed after lesions in cerebellar target regions, including ventromedial/ventrolateral thalamus (Jeljeli et al., 2003; Lalonde and Strazielle, 2007). Moreover, a role of the basal ganglia in these tasks is possible, since stress is known to alter the dopaminergic system (Metz, 2007). It is thus reasonable to expect a direct link between hypometabolic activity in ventromedial thalamus and mediodorsal striatum of CORT-injected mice and behavior.

Previous studies showed that acute glucocorticoid increases improve cognitive processes manifested by an inverted U-shaped function relative to CORT levels and dependent on synaptic plasticity (Lupien and McEwen, 1997; Akirav et al., 2004). But spatial acquisition in the Morris water maze was unaffected at the CORT doses tested, as previously observed with similar doses in rats (Akirav et al., 2004).

5. Conclusion

Both CORT and CRH are known to play a role in cerebellar motor functions affecting movement and postural adjustments. The present findings demonstrated a functional interaction between CORT and CRH/CRH-R1 in this type of function. It remains to be determined what are the molecular pathways responsible for this interaction. Motor coordination was especially affected on the rotorod, seemingly the test of choice to evaluate motor functions regarding the HPA axis in the future.

Aknowledgments: This work was partly supported by a grant from the Centre National d'Etudes Spatiales (CNES 2014 DAR4800000724 to J.-P.F.). We thank Anne-Laure Leblanc for technical help in animal rearing and injection protocol, Justine Paoli for technical help in corticosterone dosage, and Sebastien Hupont for formation on ImageJ software.

References

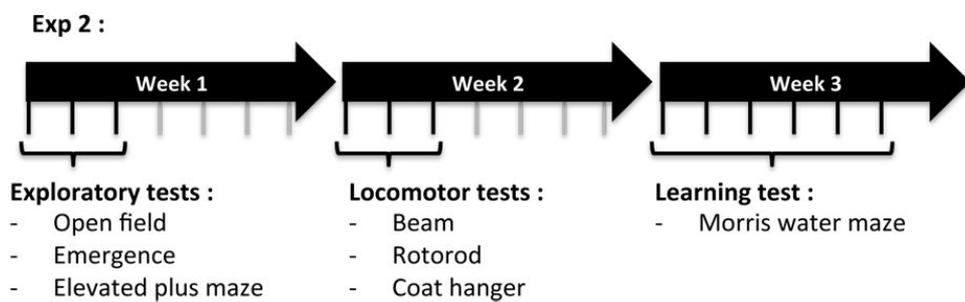
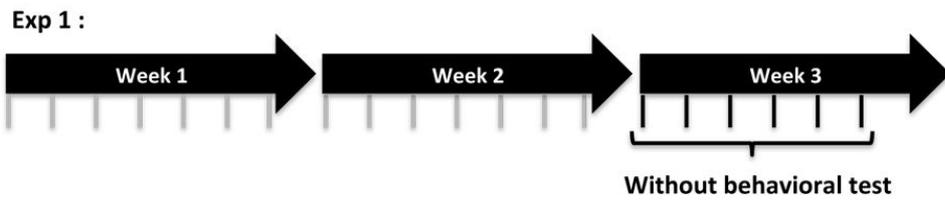
1. Akirav, I., Kozenicky, M., Tal, D., Sandi, C., Venero, C., Richter-Levin, G., 2004. A facilitate role for corticosterone in the acquisition of a spatial task under moderate stress. *Learn. Mem.* 11, 188-195.
2. Bennett, M.C., Mlady, G.W., Fleshner, M., Rose, G.M., 1996. Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1330-1334.
3. Bishop, G.A., King, J.S., 2013. Modulatory role of neuropeptides in the cerebellum, in: Manto, M., Gruol, D.L., Schmahmann, J.D., Koibuchi, N., Rossi, F. (Eds.), *Handbook of the cerebellum and cerebellar disorders*. Springer Science, Dordrecht, pp. 971-991.
4. Bishop, G.A., Seelandt, C.M., King, J.S., 2000. Cellular localization of corticotropin releasing factor receptors in the adult mouse cerebellum. *Neuroscience* 101, 1083-1092.
5. Brotto, L.A., Gorzalka, B.B., Barr, A.M., 2001. Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur. J. Pharmacol.* 424, 203-209.
6. Chen, Y., Andres, A.L., Frotscher, M., Baram, T.Z., 2012. Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front. Cell. Neurosci.* 6, 13.
7. Contarino, A., Dellu, F., Koob, G.F., Smith, G.W., Lee, K.-F., Vale, W.W., Gold, L.H., 2000. Dissociation of locomotor activation and suppression of food intake induced by CRF in CRFR1-deficient mice. *Endocrinology* 141, 2698-2702.
8. Demuyser, T., Deneyer, L., Bentea, E., Albertini, G., Van Liefferinge, J., Merckx, E., De Prins, A., De Bundel, D., Massie, A., Smolders, I., 2016. In-depth behavioral characterization of the corticosterone mouse model and the critical involvement of housing conditions. *Physiol. Behav.* 156, 199-207.

9. Detka, J., Kurek, A., Kucharczyk, M., Glombik, K., Basta-Kaim, A., Kubera, M., Iason, W., Budziszewska, B., 2015. Brain glucose metabolism in an animal model of depression. *Neuroscience* 295, 198-208.
10. Duclos, M., Martin, C., Malgat, M., Mazat, J.-P., Chaouloff, F., Mormède, P., Letellier, T., 2001. Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Eur. J. Physiol.* 443, 218-226.
11. Espallergues, J., Teegarden, S., Veerakumar, A., Boulden, J., Challis, C., Jochems, J., Chan, M., Petersen, T., Deneris, E., Matthias, P., Hahn, C., Lucki, I., Beck, S., and Berton, O., 2012. HDAC6 regulates glucocorticoid receptor signaling in serotonin pathways with critical impact on stress resilience. *J. Neurosci.* 32, 4440-4416.
12. Franklin, K.B.J., Paxinos, G., 1997. *The mouse brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, New York.
13. Goebel, M., Fleming, S.M., Million, M., Stengel, A., Taché, Y., Wang, L., 2010. Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunction. *Neurosci. Lett.* 473, 11-15.
14. Gounko, N.V., Swinny, J.D., Kalicharan, D., Jafari, S., Corteen, N., Seifi, M., Bakels, R., van der Want, J.J.L., 2013. Corticotropin-releasing factor and urocortin regulate spine and synapse formation : structural basis for stress-induced neuronal remodeling and pathology. *Mol. Psychiatry* 18, 88-92.
15. Graybiel, A.M., 1995. The basal ganglia. *Trends Neurosci.* 18, 60-62.
16. Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., Kalynchuk, L.E.L., 2005. Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.* 156, 105-114.
17. Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K.-I., Nishi, M., Kawata, M., 2005. Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neurosci. Res.* 51, 371-381.
18. Herman, J.P., Cullinan, W.E., 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78-84.

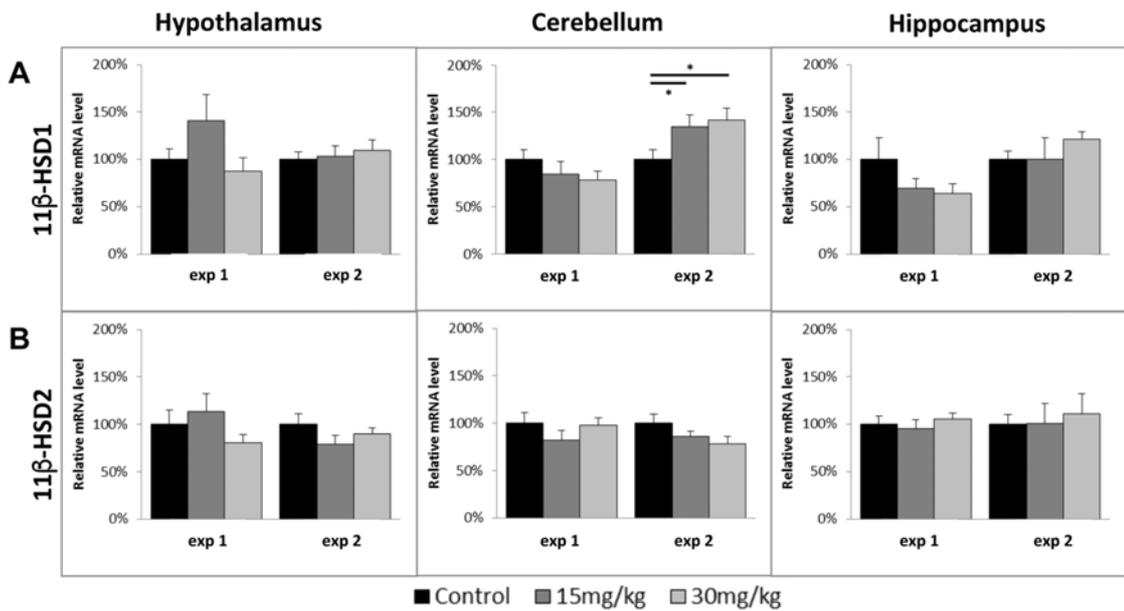
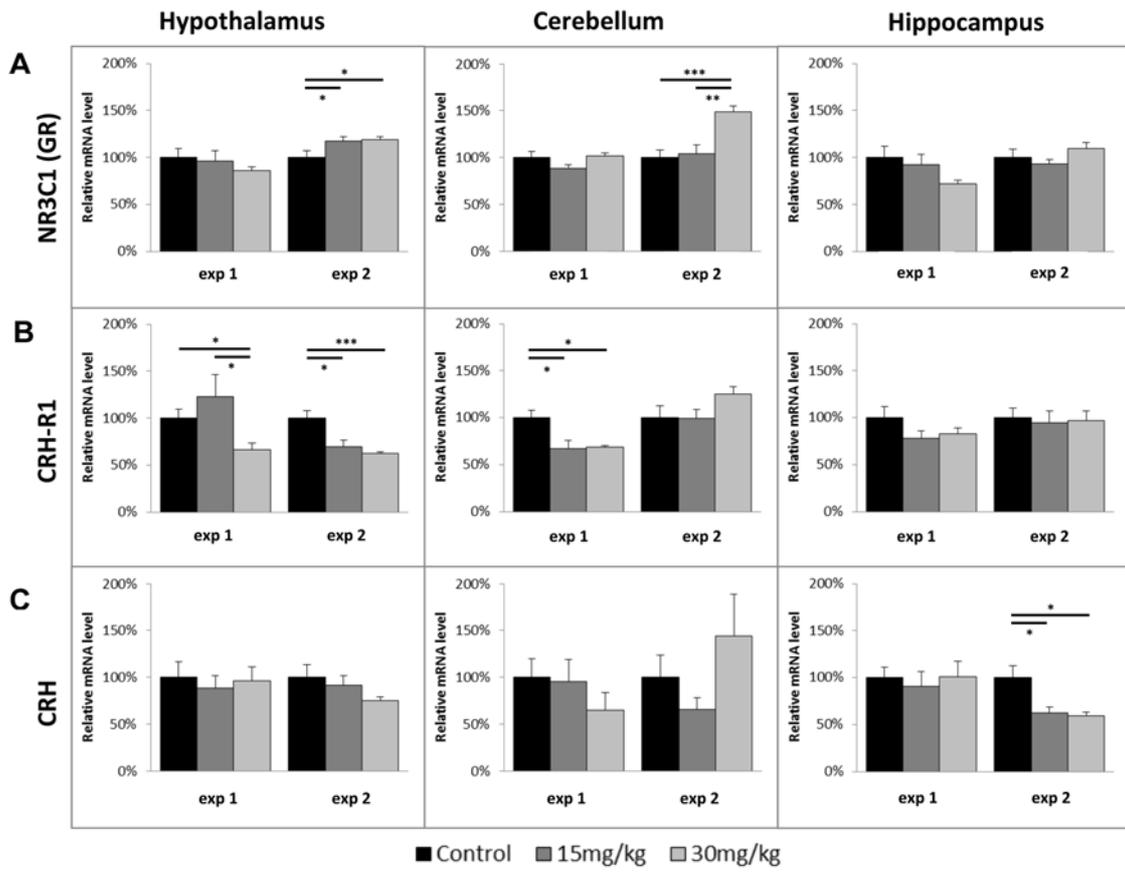
19. Howard, E., Granoff, D.M., 1968. Increased voluntary running and decreased motor coordination in mice after neonatal corticosterone implantation. *Exp. Neurol.* 22, 661-673.
20. Jeljeli, M., Strazielle, C., Caston, J., Lalonde R., 2003. Effects of ventrolateral-ventromedial thalamic lesions on motor coordination and spatial orientation in rats. *Neurosci. Res.* 47, 309-316.
21. Johnson, S.A., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2006. Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.* 168, 280-288.
22. Kott, J.M., Mooney-Leber, S.M., Shoubah, F.A., Brummelte, S., 2016. Effectiveness of different corticosterone administration methods to elevate corticosterone serum levels, induce depressive-like behavior, and affect neurogenesis levels in female rats. *Neuroscience* 312, 201-214.
23. Lalonde, R., Barraud, H., Ravey, J., Guéant, J.-L., Bronowicki, J.-P., Strazielle, C., 2008. Effects of a B-vitamin-deficient diet on exploratory activity, motor coordination, and spatial learning in young adult Balb/c mice. *Brain Res.* 1188, 122-131.
24. Lalonde, R., Strazielle, C., 2007. Brain regions and genes affecting postural control. *Prog. Neurobiol.* 81, 45-80.
25. Lepicard, E.M., Venault, P., Negroni, J., Perez-Diaz, F., Joubert, C., Nosten-Bertrand, M., Berthoz, A., Chapouthier, G., 2003. Posture and balance responses to a sensory challenge are related to anxiety in mice. *Psychiatry Res.* 118, 273-284.
26. Lim, H., Jang, S., Lee, Y., Moon, S., Kim, J., Oh, S., 2012. Enhancement of anxiety and modulation of TH and pERK expressions in amygdala by repeated injections of corticosterone. *Biomol. Ther.* 20, 418-424.
27. Liu, W., Zhou, C., 2012. Corticosterone reduces brain mitochondrial function and expression of mitofusin, BDNF in depression-like rodents regardless of exercise preconditioning. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1057-1070.

28. Lupien, S.J., McEwen, B.S., 1997. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res. Rev.* 24, 1-27.
29. Madrigal, J.L., Olivenza, R., 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.
30. Marks, W., Fournier, N.M., Kalynchuk, L.E., 2009. Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiol. Behav.* 98, 67-72.
31. Metz, G.A., 2007. Stress as a modulator of motor system function and pathology. *Rev. Neurosci.* 18, 209-222.
32. Metz, G.A.S., Schwab, M.E., Welzl, H., 2001. The effects of acute and chronic stress on motor and sensory performance in male Lewis rats. *Physiol. Behav.* 72, 29-35.
33. Mitra, R., Sapolsky, R.M., 2008. Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 5573-5578.
34. Morimoto, M., Morita, N., Ozawa, H., Yokoyama, K., Kawata, M., 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci. Res.* 26, 235-269.
35. Pecoraro, N., Dallaman, F., 2010. Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis, in : Fink, G. (Ed). *Stress Science: Neuroendocrinology*. Academic Press, Oxford, pp. 331-339.
36. Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 26, 509-515.
37. Reul, J.M.H.M., Holsboer, F., 2002. Corticotropin-releasing factor receptors 1 and 2 in anxiety and depression. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2, 23-33.

38. Rezin, G.T., Cardoso, M.R., Gonçalves, C.L., Scaini, G., Fraga, D.B., Riegel, R.E., Comim, C.M., Quevedo, J., Streck, E.L., 2008. Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem. Int.* 53, 395-400.
39. Sandi, C., Venero, C., Guaza, C., 1996. Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur. J. Neurosci.* 8, 794-800.
40. Seckl, J.R., Walker, B.R., 2004. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a modulator of glucocorticoid action: from metabolism to memory. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 9.
41. Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F., Paula-Barbosa, M.M., 2000. Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 97, 253-266.
42. Strazielle, C., Krémarik, P., Ghersi-Egea, J.-F., Lalonde, R., 1998. Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in *Lurcher* mutant mice. *Exp. Brain Res.* 121, 35-45.
43. Tagliari, B., Noschang, C.G., Ferreira, A.G.K., Ferrari, O.A., Feksa, L.R., Wannmacher, C.M.D., Dalmaz, C., Wyse, A.T.S., 2010. Chronic variable stress impairs energy metabolism in prefrontal cortex and hippocampus of rats: prevention by chronic antioxidant treatment. *Metab. Brain Dis.* 25, 169-176.
44. Van Gaalen, M.M., Stenzel-Poore, M.P., Holsboer, F., Steckler, T., 2002. Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 15, 2007-2015.
45. Wislowska-Stanek, A., Lehner, M., Skórzewska, A., Krząścik, P., Plaźnik, A., 2016. Behavioral effects and CRF expression in brain structures of high-and low-anxiety rats after chronic restraint stress. *Behav. Brain Res.* 310, 26-35.
46. Wong-Riley, M.T.T., 1989. Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 12, 94-101.



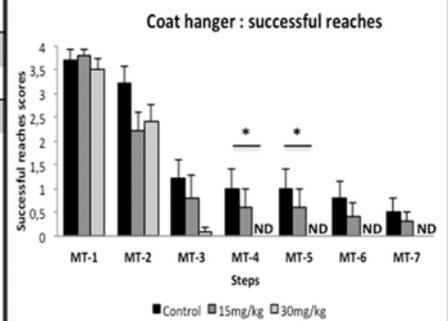
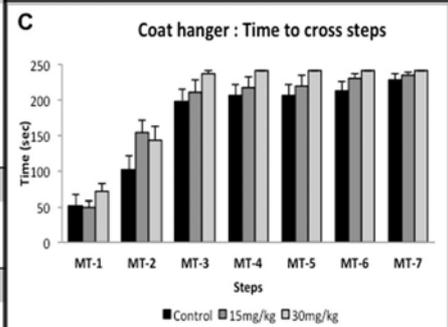
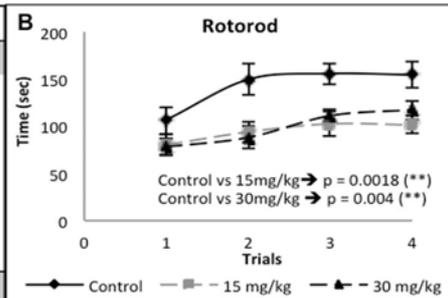
47. Yoon, S.H., Kim, B.-H., Ye, S.-K., Kim, M.-H., 2014. Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. *Korea, J. Physiol. Pharmacol.* 18, 263-268.
48. Zhang, L., Zhou, R., Li, X., Ursano, R.J., Li, H., 2006. Stress-induced change of mitochondria membrane potential regulated by genomic and non-genomic GR signaling: a possible mechanism for hippocampus atrophy in PTSD. *Med. Hypotheses* 66, 1205-1208.
49. Zhao, Y., Xie, W., Dai, J., Wang, Z., Huang, Y., 2009. The varying effects of short-term and long-term corticosterone injections on depression-like behavior in mice. *Brain Res.* 1261, 82-90.



| (NCBI sequences) | Primer sequences (5'-3') | Annealing T _m (°C) | Size (bp) |
|------------------------------------|--|-------------------------------|-----------|
| Target genes | | | |
| NR3C1 (GR) (NM_008173.3) | F: CAAGGGTCTGGAGAGGACAA R: TACAGCTTCCACACGTCAGC | 61°C | 220 |
| CRH (NM_205769.2) | F: GGCATCCTGAGAGAAGTCCCTC R: ACAGAGCCACCAGCAGCATG | 60°C | 128 |
| CRH-R1 (NM_007762.4) | F: TGGTCCTGCTGATCAACTTT R: GTCTCAGATGTGGTGGATGC | 61°C | 85 |
| 11b-HSD1 (NM_008288.2) | F: TGCTTATTCTAAACCACATCAC R: TCTGCTTCAGCATGGGCAAGGC | 61°C | 139 |
| 11b-HSD2 (NM_008289.2) | F: GGTTGTGACACTGGTTTTG R: GTGGCCAGCACCGTGAAGCCC | 61°C | 71 |
| Housekeeping genes | | | |
| Ppia (NM_008907.1) | F: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC R: GCGTGTAAGTCACCACCCT | 58°C | 150 |
| Eef2 (NM_007907.2) | F: GTGGTGGACTGTGTGTCTGG R: CGCTGGAAGGTCTGGTAGAG | 58°C | 158 |
| Eif3f (NM_025344.2) | F: CATCAAGGCCTATGTCAGCA R: GTGGTGGACTGTGTGTCTGG | 61°C | 117 |

Table 1: Primers used for RTqPCR with NCBI sequences numbers accession used to designs primers.

| A | Control | 15 mg/kg | 30 mg/kg |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| Open field (mean number ± SEM) | | | |
| Fast ambulation | 1564.3 ± 105.61 | 1408.8 ± 128.96 | 1380.5 ± 105.84 |
| Slow ambulation | 261.5 ± 10.62 | 258.5 ± 17.61 | 254.7 ± 16.27 |
| Fast stereotypy | 799.6 ± 37.04 | 811.4 ± 39.24 | 799.5 ± 31.28 |
| Slow stereotypy | 112.3 ± 5.67 | 116.9 ± 3.54 | 115.5 ± 6.39 |
| Fast rear | 17.8 ± 2.38 | 15.4 ± 2.13 | 22.5 ± 4.43 |
| Slow rear | 52.4 ± 3.30 | 41.2 ± 4.44 | 43.8 ± 4.99 |
| Elevated Plus-maze (mean number or mean time in sec ± SEM) | | | |
| Entries in open arms (O) | 6.6 ± 0.73 | 6.6 ± 0.78 | 7.2 ± 0.96 |
| Entries in closed arms (C) | 9.1 ± 0.79 | 9.3 ± 0.63 | 8.1 ± 0.91 |
| Time in open arms | 90.9 ± 14.2 | 71.6 ± 8.73 | 99.1 ± 14.45 |
| Entries in (O) / (O+C) | 0.42 ± 0.05 | 0.41 ± 0.03 | 0.47 ± 0.05 |
| Time in (O) / 300 | 0.30 ± 0.05 | 0.24 ± 0.03 | 0.33 ± 0.05 |
| Emergence test (mean time in sec ± SEM) | | | |
| First trial | 15.3 ± 7.2 | 32.8 ± 17.9 | 9.9 ± 3.4 |
| Second trial | 10.9 ± 3.9 | 49.1 ± 29.6 | 19.3 ± 12.3 |
| Beam test (mean number or mean time in sec ± SEM) | | | |
| Nb of Segments | 89.9 ± 6.28 | 94.3 ± 7.36 | 93 ± 6.21 |
| Latency before falling | 240 ± 0.00 | 240 ± 0.00 | 234.5 ± 5.5 |
| Coat hanger test (mean time in sec ± SEM) | | | |
| Latency before falling | 208.2 ± 8.99 | 209.6 ± 14.24 | 203.4 ± 10.71 |
| Morris water-maze (mean time in sec ± SEM) | | | |
| Day 1 | 188.8 ± 12.9 | 158.2 ± 10.1 | 159.5 ± 15.2 |
| Day 2 | 153 ± 17.2 | 129.2 ± 15 | 150.7 ± 14.6 |
| Day 3 | 123.9 ± 14.9 | 115.1 ± 17.9 | 141.8 ± 16 |
| Day 4 | 121.6 ± 13.4 | 78.6 ± 13.8 | 103.2 ± 11.9 |
| Day 5 | 100.6 ± 9.4 | 88.6 ± 12.9 | 97.3 ± 18 |
| Probe test | 21.3 ± 2.8 | 19.4 ± 2.8 | 15.5 ± 1.7 |



| Brain regions | 15 mg/kg | 30 mg/kg | <i>p</i> | Brain regions | 15 mg/kg | 30 mg/kg | <i>p</i> |
|------------------------------|----------|----------|----------|-------------------------------------|----------|----------|----------|
| Cerebral cortex | | | | Thalamus | | | |
| M1 | -3 % | -10 % | * | Laterodorsal | -6 % | -13 % | 0.014 |
| Eye field | -6.5 % | -10 % | 0.011 | Mediodorsal | -6 % | -11 % | * |
| S1 | -7% | -7% | | Ventrolateral | -6 % | +3.5 % | |
| Prelimbic | -4 % | -9 % | 0.018 | Ventromedial | -4 % | -9 % | * |
| Cingulate | 0 % | -8 % | | Ventroposterior | -4 % | -9 % | 0.015 |
| Entorhinal | -4.5 % | -13 % | * | CM-CL | -1 % | -9 % | 0.019 |
| Basal ganglia | | | | Brainstem | | | |
| CPu DL | -1 % | -9 % | § | Midline | -6 % | -13 % | |
| CPu DM | 0 % | -6.5 % | § | Reticular | -3 % | -4 % | |
| CPu ventral | +1 % | -5 % | | Med. Habenula | -9 % | -14 % | * |
| SI-VP | -4 % | -12 % | ** | Lat. Habenula | | -2 % | |
| SN, compacta | -4 % | -5 % | | Brainstem | | | |
| SN, reticulata | 0 % | -10 % | 0.016 | Red, parvicell. | -7 % | -10 % | * |
| VTA | -2 % | 0 % | | Red, magnocell. | -10 % | -10 % | |
| Hippocampus posterior | | | | Locus coeruleus | +5 % | +2 % | |
| CA1 | -1% | -8% | * | C1 region | 0 % | -13 % | ** § |
| CA2-CA3 | -2% | -8 % | | Dorsal raphe | -8 % | -15 % | |
| DG | -1.5 % | -4 % | | Rt pontis | -7 % | -11.5% | |
| Subiculum | -5 % | -10 % | 0.017 | Rt tegmental | -4 % | -15 % | |
| Medial septum | -11 % | -13 % | | Vest, medial PV | -6.5 % | -9.5 % | |
| Lateral septum | -6.5 % | -5 % | | Vest, lateral | -4 % | -9 % | |
| BST | -4 % | -10 % | 0.017 | Vest, spinal | +1 % | -13 % | |
| Diagonal band | 0 % | -10 % | | Cerebellar nuclei and cortex | | | |
| Hypothalamus | | | | Fastigial | -6.5 % | -20 % | * |
| Preoptic area | -4 % | -15 % | 0.014 | Interpositus | -8.5 % | -13 % | ** |
| Paraventricular | -5 % | -15 % | | Dentate | -11.5% | -14 % | |
| Lateral region | -7 % | -8 % | 0.019 | Vermis region | -2 % | -7 % | |
| | | | | Crus 1-2 | -3 % | -12 % | |

Table 2: Percentage changes of cytochrome oxidase (COX) activity in brain regions of low dose (15mg/kg) and high dose (30 mg/kg) corticosterone-treated mice compared to controls. BST = bed nucleus of stria terminalis; CM/CL = centromedial-centrolateral; CPu = caudate/putamen; DG = dentate gyrus; DL = dorsolateral; DM = dorsomedial; M1 = primary motor cortex; PV = parvicellular; Rt = reticular; S1 = primary sensory cortex; SI/VP = substantia innominate/ventral pallidum; SN = substantia nigra; Vest = vestibular; VTA = ventral tegmental area.

* = $p < 0.01$ and ** = $p < 0.001$ for high dose corticosterone-treated vs control mice.

§ = $p < 0,01$ for high dose corticosterone-treated vs low dose corticosterone-treated mice.

Borderline p values ($p < 0.02$) are indicated.

Figure captions

Figure 1: Protocol design of the two corticosterone (CORT) exposure experiments.

In experiment 1 (Exp1), mice received a daily intraperitoneal CORT injection during 6 consecutive days and were killed the last day. In experiment 2 (Exp 2), mice received a CORT injection for the two first weeks during 3 consecutive days and for the third week during 6 days. One hour after each injection, mice performed different behavioral tasks and were killed the sixth day of the third week, after the behavioral test. Black arrows: weeks of protocol; black vertical bars: days with CORT injection; grey vertical bars: days without CORT injection.

Figure 2: NR3C1 (A), CRH-R1 (B), and CRH (C) mRNA levels measured in the hypothalamus, cerebellum, and hippocampal formation of controls and the CORT-treated mice for the two experiments. The results are expressed as relative mRNA levels (mean \pm SEM) compared to control mRNA levels arbitrarily set at 100%.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 3: 11b-HSD1 (A) and 11b-HSD2 (B) mRNA levels measured in the hypothalamic region, cerebellum, and hippocampal formation of controls and the CORT-treated mice for the two experiments. The results are expressed as relative mRNA levels (mean \pm SEM) compared to control mRNA levels arbitrarily set at 100%.

* $p < 0.05$.

Figure 4: Behavioral results in Exp 2: comparison between low or high-dose CORT-treated mice with controls in motor activity, beam, and Morris water maze tests (A), accelerated rotorod (B), and coat-hanger (C). The results are expressed as mean \pm SEM. In the rotorod, the eight scores were paired two by two (4 measures).

ND : undetectable

* $p < 0.05$ for controls versus low-dose or high-dose CORT-treated mice.

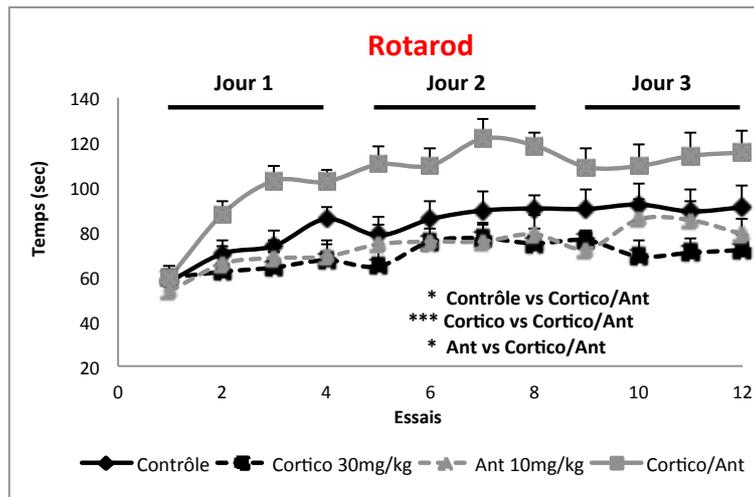


Fig 31 : Effets conjugués de la corticostérone et de l'antalarmine sur les capacités de coordination locomotrice des souris

Etudes des capacités de coordination locomotrice avec le test du rotarod, après injections de corticostérone à 30 mg/kg (groupe Cortico), d'antalarmine à 10 mg/kg (groupe Ant) ou de co-injections de corticostérone et d'antalarmine (groupe Cortico/Ant).

Analyse statistique par un test Anova à mesures répétées suivi d'un PLSD de Fisher, * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$.

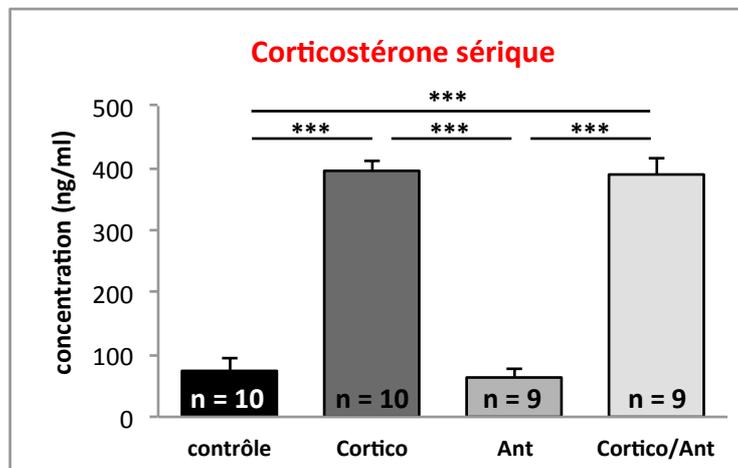


Fig 32 : Dosage de la corticostérone circulante

Quantification de la concentration de corticostérone par test ELISA réalisé sur des sérums provenant de souris ayant reçu de la corticostérone à 30 mg/kg (« Cortico »), des souris ayant reçu de l'antalarmine 10 mg/kg (« Ant ») ou de la corticostérone et de l'antalarmine (« Cortico/Ant ») comparés à un groupe de souris contrôle.

Analyse statistique par un test Anova suivi d'un PLSD de Fisher, *** : $p < 0,001$.

2 – L'inhibition du CRH-R1 augmente les capacités motrices des souris ayant subi une exposition chronique à la corticostérone

2.1 – Impact de l'inhibition du CRH-R1 sur les capacités de coordination locomotrice lors d'une exposition chronique à la corticostérone

Afin de mieux comprendre le rôle du CRH-R1 au niveau du cervelet en condition de stress, une 3^{ème} expérience (exp 3) a donc été réalisée avec des co-injections de corticostérone et d'antalarmine. Cette dernière est une molécule inhibitrice compétitive de la CRH vis-à-vis du CRH-R1. Comme pour la seconde expérience, les souris ont effectué des tests de comportement 1h après injection. Au vu des précédents résultats obtenus avec les différents tests de comportement, nous nous sommes focalisés pour cette troisième étude, sur les altérations des capacités de coordination locomotrice observées dans le test du rotarod (Fig 31).

Les résultats obtenus avec ce test montrent une légère baisse, non significative, des capacités de coordination locomotrice pour les souris n'ayant reçu que de la corticostérone à 30 mg/kg (groupe « Cortico »). Aucune altération n'a été observée chez les souris ayant reçu uniquement de l'antalarmine (groupe « Ant »). L'inhibition du CRH-R1 ne semble donc pas affecter les capacités de coordination locomotrice en conditions « physiologiques », sans stress. Toutefois, chez les souris ayant reçu les doubles injections de corticostérone et d'antalarmine (groupe « Cortico/Ant »), une nette amélioration des capacités de coordination locomotrice a été observée par rapport au groupe de souris contrôle. Il semblerait donc qu'il y ait une régulation croisée entre les deux substances et qu'en condition de stress, l'inhibition du CRH-R1 améliore les capacités de coordination locomotrice.

Suite aux expériences de comportement, les souris ont été mises à mort le 4^{ème} jour, 1h après les injections. Comme lors des précédentes études, un prélèvement de sang par ponction intracardiaque a été réalisé afin d'obtenir les sérums. Un dosage de la corticostérone sérique a été réalisé et montre une augmentation importante du taux de corticostérone circulante pour les souris des groupes « Cortico » et « Cortico/Ant » ($F(3) = 90,73$; $p < 0,0001$), (Fig 32). En effet, le niveau de corticostérone passe de 75 ng/ml pour les souris du groupe contrôle à

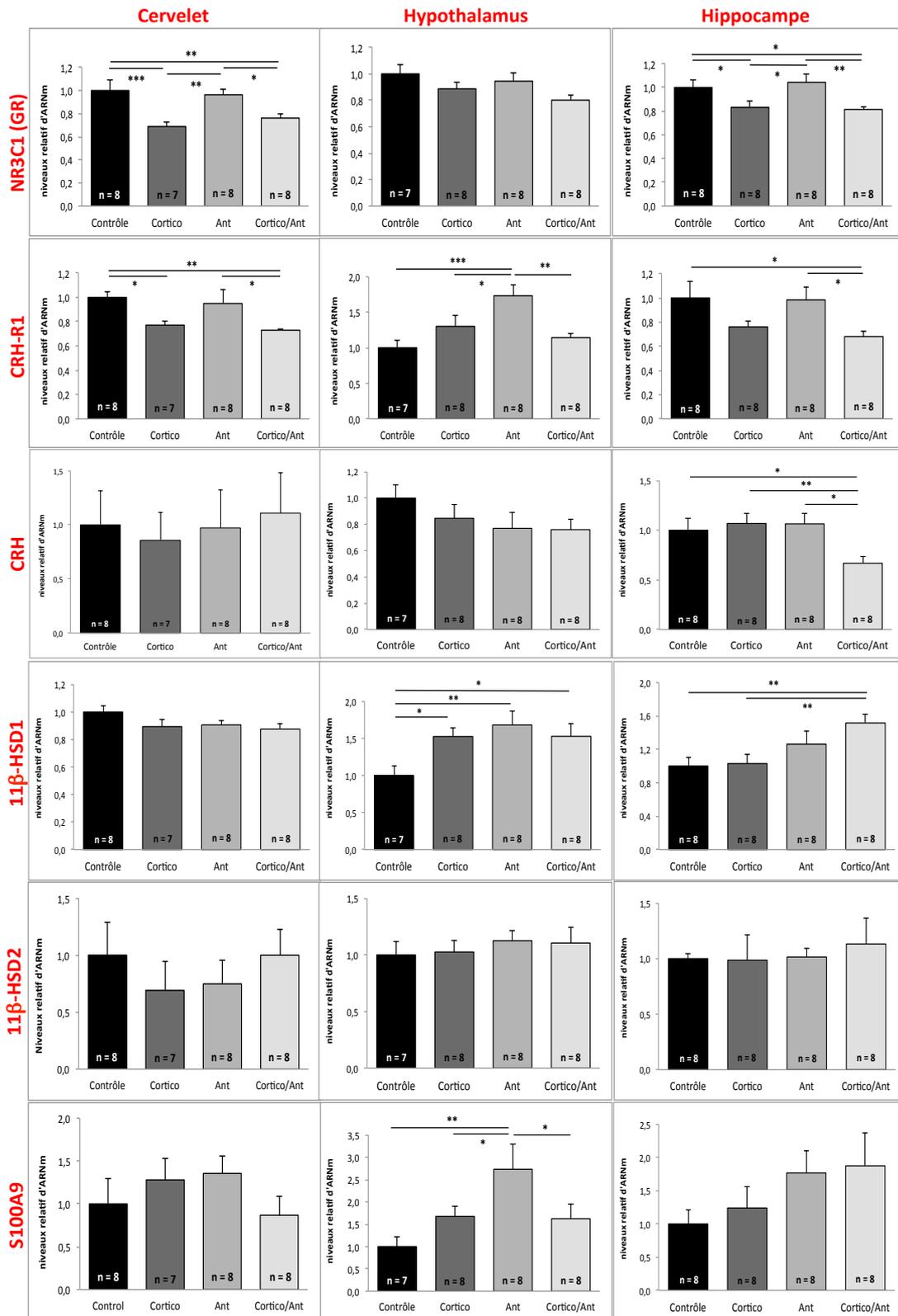


Fig 33 : Impact de la corticostérone et de l'antalarmin sur l'expression de différents ARNm impliqués dans la régulation de la réponse au stress

Analyse par RTqPCR de l'expression de NR3C1 (GR), CRH-R1, CRH, 11β-HSD1, 11β-HSD2 et S100A9 au niveau du cervelet, de l'hypothalamus et de l'hippocampe de souris ayant reçu des injections quotidiennes de corticostérone à 30 mg/kg et/ou d'antalarmin à 10 mg/kg suivies d'une évaluation des capacités de coordination locomotrice avec le test du rotarod (n = 8/groupe).

Analyse statistique : * : p < 0,05 ; ** : p < 0,01 ; *** : p < 0,001

près de 400 ng/ml chez les souris des groupes « Cortico » et « Cortico/Ant ». Pour ce qui est du groupe « Ant », le niveau de corticostérone circulante est de 65 ng/ml, donc comparable à celui des souris du groupe contrôle. L'antalarmine n'influe donc pas, à cette concentration, sur le taux de corticostérone circulante et n'induit donc pas l'activation de l'axe HHS.

Comme pour les deux autres études réalisées précédemment, l'encéphale de chaque souris a été récupéré et coupé entre les deux hémisphères. Une partie a été disséquée pour récupérer le cervelet, l'hypothalamus et l'hippocampe en vue d'effectuer des qPCR. La seconde partie a servi à l'analyse de l'activité métabolique par marquage histochimique de la COX.

Les analyses des niveaux de transcrits réalisées par qPCR (Fig 33) révèlent une diminution du niveau des transcrits des GR de 25% à 30% au niveau du cervelet ($F(3) = 6,62$; $p < 0,01$) et de 15% à 20% au niveau de l'hippocampe ($F(3) = 4,49$; $p < 0,05$) respectivement pour les souris du groupe « Cortico » et les souris du groupe « Cortico/Ant ». En revanche, aucune variation n'est observée pour ce marqueur pour les souris du groupe « Ant », qui ont donc un niveau de transcrits des GR équivalent aux souris du groupe contrôle. Il ne semble pas non plus y avoir de variation d'expression des ARNm des GR au niveau de l'hypothalamus, et ce, quelque soit le groupe de souris.

Concernant les ARNm du CRH-R1, le même profil de variation des taux de transcrits est observé au niveau du cervelet et de l'hippocampe. En effet, une diminution d'environ 20% du niveau des ARNm du CRH-R1 est observée au niveau du cervelet ($F(3) = 3,79$; $p < 0,05$) chez les souris des groupes « Cortico » et « Cortico/ant », et cette diminution est de l'ordre de 30% au niveau de l'hippocampe ($F(3) = 3,0$; $p < 0,05$) pour le groupe « Cortico/Ant ». Une diminution de 25% du niveau des ARNm du CRH-R1 est également observée pour le groupe « Cortico » au niveau de l'hippocampe mais cette diminution n'est pas significative. Comme pour les GR, aucune variation du taux d'ARNm du CRH-R1 n'est observée chez les souris du groupe « Ant ». Par contre, au niveau de l'hypothalamus, le niveau de transcrits du CRH-R1 augmente d'environ 7% chez les souris du groupe « Ant » ($F(3) = 6,32$; $p < 0,01$).

Concernant l'ARNm de la CRH, aucune variation du niveau des transcrits n'est observée aussi bien dans le cervelet que dans l'hypothalamus et ce, quelque soit le

| Régions | Cortico | Ant | Cortico/ Ant | Valeur de p |
|-------------------------------------|---------|-----|-----------------|----------------|
| Cortex cérébral | | | | |
| M1 | -2% | +1% | +2% | |
| M2 | -1% | 0% | +2% | |
| Cingulaire | -4% | +4% | -1% | |
| Ganglions de la base | | | | |
| CPu dorsolat. | -6% | -3% | -2% | |
| CPu dorsomed. | -6% | -1% | -1% | |
| CPu ventral | -10% | -8% | -4% | p = 0,012 |
| SI-VP | -7% | -6% | -5% | |
| SN, compacta | -2% | +2% | +1% | |
| SN, reticulata | -3% | 0% | +3% | |
| Thalamus | | | | |
| ventrolatérale | -1% | 0% | -1% | |
| ventromédian | -8% | -3% | -1% | |
| ventropostérieur | +4% | -1% | -1% | |
| Noyaux et cortex cérébelleux | | | | |
| fastigial | -3% | -6% | -2% | |
| interposé | -7% | -1% | -1% | |
| dentelé | -6% | -4% | +4% | |

Tab 4 : Impact de la corticostérone et/ou de l'antalarmine sur l'activité métabolique régionale du cerveau de souris

Analyse de l'activité métabolique régionale par marquage histochimique de la cytochrome oxidase (COX) sur des cerveaux de souris ayant reçu des injections répétées de corticostérone à 30 mg/kg et/ou d'antalarmine à 10 mg/kg suivies du test du rotarod. Les valeurs indiquées dans le tableau représentent les pourcentages d'augmentation ou de diminution de l'activité de la COX comparés au groupe de souris contrôle.

groupe de souris. Par contre, une diminution de près de 30% du niveau d'expression de ce marqueur est observée au niveau de l'hippocampe, pour le groupe de souris « Cortico/Ant » ($F(3) = 3,48$; $p < 0,05$).

L'analyse du taux d'ARNm de la 11β -HSD1 ne montre pas de variation du niveau des transcrits au niveau du cervelet, quelque soit le groupe de souris. Par contre, une augmentation de 50% est observée au niveau de l'hypothalamus ($F(3) = 3,37$; $p < 0,05$) pour les groupes de souris « Cortico » et « Cortico/Ant », et cette augmentation est de 70% pour le groupe de souris « Ant ». Au niveau de l'hippocampe, le niveau d'ARNm de la 11β -HSD1 augmente également de près de 50%, mais uniquement pour le groupe de souris « Cortico/Ant » ($F(3) = 4,45$; $p < 0,05$).

L'étude du taux de transcrits de la 11β -HSD2 ne montre aucune variation du niveau des transcrits quelque soit les structures (cervelet, hypothalamus et hippocampe) et les groupes de souris.

En plus de ces différents marqueurs impliqués dans la régulation de la réponse au stress, le niveau d'expression du marqueur de l'inflammation S100A9 a également été étudié lors de cette expérience. L'analyse par qPCR montre une augmentation de l'ARNm de près de 170% dans l'hypothalamus ($F(3) = 3,92$; $p < 0,05$) pour le groupe de souris « Ant », similaire au profil d'expression du CRH-R1 déjà observé dans l'hypothalamus de ces souris. Aucune autre variation de l'ARNm de S100A9 n'est observée dans les autres structures (cervelet ou hippocampe).

Concernant l'étude de l'activité métabolique au sein du SNC, les analyses sont actuellement en cours. Toutefois, des résultats préliminaires (Tab 4) ne semblent pas montrer de différences majeures de l'activité métabolique dans la quinzaine de régions étudiées. Il semblerait donc que 4 jours d'injection de corticostérone ne soit pas suffisants pour faire varier l'activité de la COX. Dans les deux études précédentes, les souris étaient exposées pendant 6 jours minimum à la corticostérone, ce qui peut expliquer les différences de résultats obtenus comparés à ceux de la première expérience. Toutefois, en regardant ces premiers résultats on remarque que dans certaines régions, l'activité de la COX semble légèrement altérée. En effet, notamment au niveau du striatum ventral, l'activité métabolique est légèrement plus faible avec une baisse de 10% proche de la significativité ($F(3) = 4,43$; $p = 0,012$), pour le groupe de souris « Cortico ». Cette différence est moindre

pour le groupe de souris « Ant » et très faible pour le groupe de souris « Cortico/Ant ». Nous ne retrouvons pas de différences importantes au niveau des autres structures étudiées. Cependant, l'activité métabolique de certaines régions, telles que les striatum dorsolatéral et dorsomédian, le noyau ventromédian du thalamus et le noyau interposé du cervelet, est plus faible dans le groupe de souris « Cortico », alors que pour les souris des groupes « Ant » et « Cortico/Ant », l'activité métabolique est proche du groupe contrôle. Néanmoins, ces premières données nécessitent d'être confirmées et complétées avec les mesures d'autres structures comme le noyau rouge, la substance réticulée ou le cortex cérébelleux.

2.2 – Discussion

De par son rôle dans la réponse au stress, la CRH est un acteur primordial dont il est important de mieux connaître l'action et ses régulations lors d'un stress. Les résultats de nos deux premières études, en accord avec la littérature, ont montré qu'un stress induit une altération des capacités de coordination locomotrice. De plus, cette altération est associée à une diminution du niveau d'expression de l'ARNm du CRH-R1 au niveau du cervelet, structure jouant un rôle important dans la régulation des fonctions de coordination locomotrice. A ce jour, à notre connaissance, une seule étude a été réalisée pour évaluer l'impact de la CRH sur les fonctions cérébelleuses et l'activité de coordination locomotrice. Au cours de cette étude, l'utilisation de l'astressine (antagoniste non spécifique de la CRH car inhibant à la fois le CRH-R1 et le CRH-R2) a permis de mettre en évidence une altération de la coordination locomotrice dans le test du rotarod ([Bishop and King, 2013](#)). L'antagoniste utilisé dans cette étude n'étant pas spécifique, il n'est malheureusement pas possible de définir si cette altération est le fait de l'inhibition du CRH-R1 ou du CRH-R2, voire des deux récepteurs. Pour mieux comprendre le rôle de la CRH et du CRH-R1 au niveau du cervelet en condition de stress, nous avons donc réalisé une étude visant à inhiber spécifiquement l'activation du CRH-R1 avec de l'antalarmine et en mimant un stress avec des injections de corticostérone. Pour cette expérience, nous avons choisi d'utiliser uniquement la corticostérone à 30 mg/kg car c'est avec cette dose injectée que nous avons obtenu les résultats les plus probants lors des deux premières expériences. Le choix de la dose

d'antalarmine à 10 mg/kg a été fait suite à des études préliminaires réalisées au laboratoire (données non publiées). Au cours de cette étude, de l'antalarmine à 10 et 20 mg/kg a été injectée par voie intra-péritonéale à des souris puis une évaluation comportementale a été réalisée. Les résultats les plus intéressants ont été observés avec l'antalarmine à 10 mg/kg. Nous avons donc choisi de garder ce dosage pour notre étude. De plus, l'antalarmine pouvant avoir une toxicité à partir de 30 mg/kg, il nous a paru judicieux d'éviter de prendre le dosage à 20 mg/kg.

Lors de cette troisième étude, nous retrouvons une légère diminution des capacités de coordination locomotrice chez les souris stressées ayant reçu de la corticostérone. Nous montrons également qu'une simple inhibition du CRH-R1, via l'antalarmine, sans ajout de corticostérone, ne semble pas affecter les capacités de coordination locomotrice des souris. Par contre, lorsque l'activité du CRH-R1 est inhibée par l'antalarmine en condition de stress, mimé par l'injection de corticostérone à 30 mg/kg, les capacités de coordination locomotrice des souris sont fortement améliorées. Il semble donc que la CRH, via le CRH-R1, joue un rôle important dans la régulation des fonctions de coordination locomotrice.

Une étude récente tend à montrer que l'action de la CRH au niveau du cervelet active les deux cibles afférentes des cellules de Purkinje que sont les cellules à grain à l'origine des fibres parallèles, qui forment des synapses avec les dendrites distaux des cellules de Purkinje et, les fibres grimpantes venant de l'olive bulbaire. Lorsque les fibres grimpantes ne sont pas actives, il semble que la CRH améliore l'activation des cellules de Purkinje. Lorsque ces fibres grimpantes sont activées, l'effet inverse est observé et la CRH entraînerait une inactivation des fibres parallèles. Donc, l'état d'activation des fibres grimpantes joue un rôle important sur l'impact de la CRH au niveau du cervelet ([Bishop and King, 2013](#)).

Les variations d'expression des ARNm des différents marqueurs étudiés en qPCR, GR, CRH-R1, 11 β -HSD1, 11 β -HSD2, peuvent principalement s'expliquer par l'action de la corticostérone. En effet, l'antalarmine seule n'a pas d'effet sur l'expression des deux marqueurs GR et CRH-R1 au niveau du cervelet et de l'hippocampe et ne reverse pas les phénomènes observés avec la corticostérone. Toutefois, il est intéressant de noter l'augmentation de l'expression du CRH-R1 au niveau de l'hypothalamus dans le groupe de souris n'ayant reçu que de l'antalarmine. Ce résultat est relativement inattendu car l'antalarmine, qui est un antagoniste du CRH-R1, n'active pas le récepteur en se fixant dessus. De plus, cette augmentation

d'expression à lieu au niveau de l'hypothalamus mais pas au niveau du cervelet ni de l'hippocampe. L'expression de l'ARNm de S100A9, qui est un marqueur d'inflammation, se retrouve également augmenté dans l'hypothalamus de ce même groupe de souris ayant reçu de l'antalarmine. La protéine S100A9 (aussi appelée calgranuline) est connue pour s'associer avec S100A8 formant ainsi un hétérodimère appelé le complexe calprotectine.

A ce jour, aucune étude ne mentionne la présence et encore moins la fonction de S100A9 au niveau de l'hypothalamus. Aucun lien n'a également été décrit entre cette protéine et la CRH et/ou ses récepteurs. Pourtant, la similarité du profil de régulation entre les ARNm de CRH-R1 et de S100A9 observée au niveau de l'hypothalamus pose la question d'un lien pouvant exister entre ces deux marqueurs. Une des hypothèses, suite à nos résultats, pourrait être que l'inhibition du CRH-R1 par l'antalarmine rende l'hypothalamus insensible à sa propre production de CRH. L'hypothalamus augmenterait alors sa production de S100A9, qui une fois passé dans le milieu extracellulaire pourrait promouvoir la production, entres autres d'IL-1 et d'IL-6 par des PBMC (Simard et al., 2013), or ces deux cytokines augmentent la production de la CRH, de l'ACTH et des glucocorticoïdes.

Au cours de cette troisième étude, une légère diminution de l'activité métabolique est observée et elle affecte très peu de régions du cerveau pour le groupe de souris ayant reçu uniquement de la corticostérone à 30 mg/kg. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors des premières études : l'altération de l'activité métabolique induite par une exposition à la corticostérone s'amoinde lorsque l'animal est soumis à un entraînement physique. De plus, l'activité métabolique ne varie pas ou peu lorsque les CRH-R1 sont inhibés avec de l'antalarmine et cela, en présence ou non de corticostérone. Il se pourrait donc que la CRH, en plus des glucocorticoïdes, puisse également jouer un rôle dans la régulation de l'activité métabolique. Toutefois, l'hypométabolisme persistant dans le thalamus moteur confirme l'importance fonctionnelle de cette région dans le test du rotarod (Jeljeli et al., 2003).

De précédentes études ont montré que la CRH pouvait induire un stress oxydatif se traduisant par une altération du cycle du glutathion entraînant alors une augmentation des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO). L'inhibition du CRH-R1, aussi bien dans un modèle de souris transgénique pour la maladie d'Alzheimer que lors

d'études *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines (lignée EAhy926), réduit ce stress oxydatif (Gougoura et al., 2010; Zhang et al., 2015). Lors d'un stress oxydatif, la fonction mitochondriale est altérée entraînant un dysfonctionnement de la cytochrome c oxydase (COX), (Srinivasan and Avadhani, 2012). Il semble donc que la CRH puisse également avoir un impact, direct ou indirect, sur l'activité métabolique cellulaire. Les glucocorticoïdes ne seraient donc pas les seuls acteurs conduisant aux altérations de l'activité métabolique observées dans notre étude. Ceci pourrait expliquer le fait qu'en présence d'antalarmine, avec ou sans corticostérone, les altérations de l'activité de la COX soient moindres qu'en présence de corticostérone seule. Pour tester cette hypothèse, il faudrait étudier certains marqueurs de stress oxydatif tels que l'oxydation des guanines au niveau de l'ADN (8-OHdG ou 8-hydroxy-2'-déoxyguanosine). En effet, cette oxydation occasionne des lésions de l'ADN hautement mutagènes et stables et de fait, est considérée comme étant un bon marqueur de l'état de stress oxydatif au sein d'un tissu (Ma et al., 2008; Strazielle et al., 2009).

V – Matériels et méthodes pour la partie immunologie

1 – Animaux

Pour toutes les études, des souris C57Bl/6J mâles (Charles River, France), âgées de 14-18 semaines ont été utilisées. Les souris ont été hébergées dans des cages en plexiglas transparent (longueur : 30 cm, largeur : 11 cm, hauteur : 12 cm), placées dans des armoires ventilées (A-box, Noroit, France) et maintenues dans des conditions standard de luminosité (cycles de 12 h de lumière / 12 h d'obscurité) avec un libre accès à la nourriture et à l'eau. Toutes les expérimentations *in vivo* ont été conduites selon les directives de l'Union européenne (2010/63/UE) et la législation en vigueur au sein de l'université de Lorraine (n° d'agrément : CELMEA-2012-0008).

2 – Culture cellulaire

2.1 – *Stimulation in vitro de splénocytes murins*

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane, mises à mort par dislocation des vertèbres cervicales et leur rate a été mise dans du milieu de culture enrichi, composé de RPMI 1640, de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté 30 min à 56°C, de 1% de streptomycine/pénicilline, de 1% d'HEPES, de 1% de pyruvate de sodium, de 1% d'acides aminés non essentiels et de 2µL de β-mercaptoéthanol (soit 57,2 µM final). Tous ces produits proviennent de chez Sigma-Aldrich (France). La rate a ensuite été dissociée sur un tamis cellulaire de 70 µm (EASYstrainer, Greiner bio-one, Dutscher, France), puis les splénocytes en suspension ont été centrifugés à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C. Le culot cellulaire a alors été repris dans 2 mL de tampon RGB 1X (eBioscience, France) pendant 2 min à température ambiante, afin de lyser les globules rouges. La réaction de lyse a ensuite été arrêtée avec 10 mL de milieu de culture RPMI enrichi et les cellules ont à nouveau été centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C. Le culot cellulaire ainsi obtenu a été lavé dans 10 mL de milieu de culture enrichi et centrifugé à 1600 rpm

pendant 5 min à 7°C. Le culot obtenu a été repris dans 6 mL de milieu de culture RPMI enrichi pour notamment effectuer une numération cellulaire.

Les splénocytes ont ensuite été mis en culture à une densité de 10^6 cellules/mL et stimulées ou non avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM (Bachem, Allemagne). Au bout de 48 h de culture, une numération cellulaire a été réalisée et les splénocytes ont été récupérés pour des analyses en cytométrie en flux (FACS), en immunofluorescence (IF), en western blotting (WB) ou en PCR quantitative en temps réel (qPCR).

2.2 – Purification des lymphocytes B (L_B) murins par sélection négative

La purification des L_B a été réalisée par sélection négative avec le kit « EasySep™ Mouse B Cell Isolation » (Stem Cell, France). Grâce à un cocktail d'anticorps, l'ensemble des cellules de la rate à l'exception des L_B , va être reconnu et fixé par ces Ac. Les L_B non fixés et donc non activés vont ainsi être récupérés.

Plus précisément, les splénocytes ont été repris dans du tampon PBS-SVF 2% à une densité de 10^8 cellules/mL dans un tube stérile de 5 mL et 50 μ L/mL de sérum de rat provenant du kit ont été ajoutés. Après un ajout supplémentaire de 50 μ L/mL du cocktail d'anticorps, l'ensemble a été homogénéisé doucement par pipetage et incubé pendant 10 min à température ambiante. Puis 75 μ L/mL de streptavidine couplée à des billes magnétiques ont été ajoutés au mélange et le tout a été incubé 2 min 30 à température ambiante. Du tampon PBS-SVF 2% a ensuite été rajouté pour avoir un volume final de 2,5 mL. Le tube de 5 mL a été placé dans une enceinte aimantée « EasySep™ Magnet » (Stem Cell, France) pendant 2 min 30, puis retourné pour récupérer la fraction négative contenant les L_B .

Après chaque purification, 10^5 cellules ont été utilisées pour la cytométrie en flux afin de vérifier la pureté des L_B obtenus. Cette vérification a été faite avec un co-marquage d'Ac anti CD19-PC7 (marqueur spécifique des L_B) et d'Ac anti CD3-APC (marqueur spécifique des L_T) tous deux utilisés au 1/100^{ème} (eBioscience, France).

2.3 – Stimulation in vitro de L_B purifiés

Les L_B purifiés issus des rates de deux souris ont été divisés en trois lots : un premier lot pour vérifier la pureté par cytométrie en flux, un autre pour extraire les

protéines correspondant au « T0 extraction » et le troisième, pour faire de la culture cellulaire. Pour cette culture cellulaire, les L_B ont donc été mis dans du milieu RPMI enrichi, à une densité de 10^6 cellules/mL et laissés en culture pendant 2 h pour qu'ils reviennent à un état basal d'activation après l'extraction et la purification à partir de la rate. Ces cellules B ont ensuite été stimulées ou pas avec de la CRH à 1 nM ou à 100 nM pendant 15 min, 30 min, 1 h et 3 h. A la fin de chaque point de cinétique, les cellules ont été récupérées pour extraire les protéines afin d'étudier, entre autres, les voies de signalisation activées par la CRH. Avant le début de la stimulation, des cellules ont été récupérées pour extraire les protéines correspondant ainsi au « T0 stimulation ».

3 – Analyses par cytométrie en flux (FACS)

3.1 – Analyses effectuées sur les splénocytes totaux

Après stimulation ou non avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM, 2.10^5 splénocytes ont servi pour une analyse en FACS et le reste des cellules a servi à la purification de L_B (cf ; II.6.2). Pour le FACS, les splénocytes stimulés ou non par la CRH ont été répartis dans 2 tubes de 5 mL, soit 10^5 cellules par tube. Après un lavage avec 1 mL de PBS-BSA 0,5%, les cellules ont été centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C et le culot cellulaire a été repris dans 100 μ L de PBS-BSA 0,5%. Puis, les cellules ont été incubées pendant 1h à 4°C soit dans du PBS-BSA 0,5% sans Ac pour calibrer l'appareil lors de l'analyse, soit dans du PBS-BSA 0,5% avec un cocktail d'Ac dilués au 1/100^{ème} (Ac anti CD3-APC, Ac anti CD4-PE, Ac anti CD19-PC7 ; eBioscience, France) pour le deuxième tube. Au bout d'1 h à 4°C, les cellules ont ensuite été lavées dans 1 mL de tampon PBS-BSA 0,5%, puis centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C. Le culot cellulaire du premier tube a été repris dans 300 μ L de PBS-BSA 0,5%, alors que le culot cellulaire du deuxième tube a été repris dans 100 μ L de tampon « Annexine V » avec 1 μ L d'Annexine V-FITC (BD Bioscience, France). Au bout de 20 min d'incubation à température ambiante, 200 μ L de tampon « Annexine V » ont été rajoutés au 2^{ème} tube afin d'avoir un volume final de 300 μ L.

Pour chaque Ac utilisé, Ac anti CD3, Ac anti CD4 et Ac anti CD19, des mono-marquages ont été réalisés à l'aide de billes prévues à cet effet (eBioscience, France). Ces mono-marquages permettent de réaliser les compensations entre les différents fluorochromes lors de l'analyse. Pour cela, 1 μ L de chaque Ac a été marqué dans un volume d'environ 50 μ L de billes (équivalent d'une goutte) pendant 20 min à 4°C. Celles-ci sont ensuite lavées dans un 1 mL de tampon PBS-BSA 0,5% puis sont centrifugées pendant 5 min à 500 g à 7°C. Pour finir, le culot de billes mono-marquées est repris dans 300 μ L de tampon PBS-BSA 0,5%.

L'acquisition des résultats a été réalisée sur le cytomètre en flux Gallios (Beckmann and Coulters, France) au sein de la plateforme INSERM UMR 1116. L'analyse des données a été réalisée grâce au logiciel FlowJo®.

3.2 – Analyses sur les L_B purifiés

L'analyse par FACS des L_B purifiés a été faite de la même façon que pour les splénocytes totaux (cf : 7.1). Pour chaque condition de stimulation, 10^5 cellules ont été incubées dans du tampon PBS-BSA 0,5% avec un cocktail d'Ac dilués au 1/100^{ème} (Ac anti CD3-APC et Ac anti CD19-PC7, eBioscience, France) et un Ac anti CRHR-FITC (BIOSS Antibodies, USA) dilué au 1/50^{ème} pendant 1 h à 4°C. Les cellules ont alors été lavées dans 1 mL de tampon PBS-BSA 0,5%, centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C et le culot cellulaire a ensuite été repris dans 300 μ L de tampon PBS-BSA 0,5%. Le même marquage (Ac anti CD3, Ac anti CD4, Ac anti CD19) a été réalisé sur les échantillons avec un contrôle isotypique-FITC (BIOSS Antibodies, USA) afin de vérifier la spécificité du marquage CRH-R détecté.

L'acquisition et l'analyse des L_B purifiés ont été réalisées de la même façon que pour les splénocytes totaux.

4 – Extraction de protéines et Western blotting (WB)

Pour extraire les protéines, les cellules ont été centrifugées à 1600 rpm pendant 5 min à 7°C et le culot a été repris dans 50 μ L de tampon de lyse pour protéines (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8.0, 1% de Nonidet 40) afin de lyser $5 \cdot 10^5$ cellules. Les lysats ont été homogénéisés régulièrement au vortex et mis à incuber

pendant 1 h à 4°C, pour que la lyse soit optimale et pour récupérer les protéines membranaires dans le meilleur état possible. Au bout d'1 h, les débris cellulaires ont été culottés à 10.000g pendant 10 min à 4°C et les surnageants contenant les protéines ont été récupérés.

Après avoir quantifié les protéines par un test de Bradford (Thermo Scientific, France), 20 µg ont été déposés sur un gel d'acrylamide-SDS de 10 à 12% selon la masse moléculaire des protéines étudiées. Après une migration d'environ 1h30 à 110 V constant, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (Thermo Scientific, France) pendant 1h à 100 V constant. Une fois le transfert terminé, une coloration au rouge ponceau (Sigma-Aldrich, France) a été réalisée afin de vérifier la présence et le profil des protéines sur la membrane. Celle-ci a ensuite été lavée avec du tampon TBS-Tween 0.1% (TBST) puis mise dans du TBST-lait écrémé 5% ou dans du TBST-BSA 5%, 1h à température ambiante sous agitation afin de bloquer par saturation les sites de fixation aspécifiques. Puis, un marquage avec un anticorps (Ac) primaire anti-CRH-R (BIOSS USA, Interchim, France) ou anti-tubuline α (Abcam, France) a été réalisé pendant une nuit à 4°C sous agitation en TBST-BSA 5% ou en TBST-lait écrémé 5%. Le lendemain, la membrane a été lavée 3 fois 10 min dans du TBST à température ambiante sous agitation. Un Ac secondaire anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase de raifort (dilué au 1/5000^{ème} dans du TBST-lait 5%) a alors été mis au contact de la membrane pendant 1h à température ambiante sous agitation. La membrane a ensuite été lavée 3 fois pendant 10 min dans du tampon TBST à température ambiante et une solution de révélation (Pierce, France) a été déposée sur la membrane. La révélation de la membrane et l'acquisition des données ont été réalisées avec l'imageur « Fusion FX-7 » (Vuilber Lourmat, France).

Pour étudier plusieurs protéines de même masse moléculaire sur une même membrane, il est nécessaire de la deshybrider à l'aide d'une solution de deshybridation (Thermo Scientific, France) pendant 5-10 min à température ambiante. Cette membrane est ensuite lavée en TBST pendant 5 min puis de nouveau saturée avec une solution de TBST-lait écrémé 5% ou TBST-BSA 5% pendant 30 min. Après vérification de la deshybridation avec l'imageur FX-7, une nouvelle incubation d'Ac primaire et secondaire peut être réalisée sur la membrane.

5 – Marquage par immunofluorescence (IF)

Après 48h de stimulation avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM, 5.10^5 splénocytes ont été repris dans 100 μ L de tampon PBS. Cette suspension a ensuite été déposée sur une lame de verre ayant subi un traitement facilitant l'adhésion des cellules (Starfrost, Dutscher, France). Après une incubation de 15 min à température ambiante dans une chambre humide, afin de laisser les cellules sédimenter et adhérer à la lame, 3 lavages de 10 min ont été réalisés avec du tampon PBS-BSA à 0,5%. Les cellules ont ensuite été fixées dans du paraformaldéhyde à 4% (PAF, Sigma-Aldrich, France) pendant 30 min à température ambiante. Ensuite, 3 lavages de 10 min dans du tampon PBS-BSA 0,5% ont été réalisés suivis d'une perméabilisation pendant 1h dans du tampon PBS-BSA 0,5% contenant 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, France). Après 3 lavages de 10 min, une étape de blocage a été réalisée pendant 1h dans du tampon PBS-BSA 0,5% contenant 0,1% de Triton X-100 et 10% de sérum de chèvre (Sigma-Aldrich, France). Les lames ont été à nouveau lavées 3 fois 10 min puis incubées pendant 1h à température ambiante avec un Ac de lapin anti-CRH-R au $1/50^{\text{ème}}$ (BIOSS Antibodies, USA) et un Ac de rat anti-CD19 au $1/50^{\text{ème}}$ (eBioscience, France). Tous les Ac ont été dilués dans du tampon PBS-BSA 0,5% avec 0,1% de Triton X-100 et 10% de sérum de chèvre. Les lames ont ensuite été lavées 3 fois avec du tampon PBS-BSA 0,5% puis incubées 1h à température ambiante avec un Ac anti-Fc d'IgG de lapin couplé à l'Alexa Fluor® 488 (Thermo Scientific, France) et un Ac anti-Fc d'IgG de rat couplé à l'Alexa Fluor® 546 (Thermo Scientific, France) tous deux dilués au $1/250^{\text{ème}}$ dans du tampon PBS-BSA 0,5% avec 0,1% de Triton X-100 et 10% de sérum de chèvre. Après ce dernier marquage, les lames ont été lavées 3 fois pendant 10 min puis un marquage des noyaux a été réalisé par application de Hoechst 33342 (Thermo Scientific, France) pendant 5 min. Trois derniers lavages de 10 min ont été réalisés avec du tampon PBS-BSA 0,5% puis les lames ont ensuite été montées au Mowiol (Sigma-Aldrich, France) et conservées à 4°C une nuit avant de prendre des photos à l'aide d'un microscope à fluorescence (Olympus, France). Les photos prises ont ensuite été analysées grâce au logiciel ImageJ®.

6 – Extractions des ARNs et transcription inverse

6.1 – Extractions des ARNs avec du Trizol

Les échantillons ont été lysés dans 500 μ L de Trizol®. Après une incubation d'au moins 5 min à 4°C, 100 μ L de chloroforme ont été ajoutés puis le mélange a été homogénéisé au vortex. Les échantillons, refroidis pendant 2 min dans de la glace, ont été centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. A la fin de la centrifugation, la phase aqueuse a été prélevée puis traitée à la DNase I (MBI, Fermentas, France) pendant 30 min à 37°C afin d'éliminer d'éventuelles traces d'ADN génomique. Puis, 300 μ L d'éthanol absolu ont été ajoutés dans chaque tube pour précipiter les ARNs. Après une incubation d'au moins 30 min à -20°C, les tubes ont été centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. Les culots ont été lavés dans 400 μ L d'éthanol à 70%, puis centrifugés à 11000 g pendant 15 min à 4°C. Cette opération a été faite une deuxième fois et les culots ont été séchés puis repris dans un volume de 20 à 50 μ L d'eau ultra pure.

Pour chaque échantillon, un aliquot d'ARN total a ensuite été dosés au Nanodrop (Thermo Scientific, France) afin d'évaluer la quantité d'ARN récupérée. Un autre aliquot a été déposé sur gel d'agarose à 0,8% contenant du BET (bromure d'éthidium) afin de vérifier la qualité des ARN obtenus.

6.2 – Transcription inverse des ARNm

Une fois les ARN totaux extraits et dosés, l'équivalent de 200 ng d'ARN a été incubé avec 1 μ L de dNTPs (10 mM) et 1 μ L de « random hexamers » (50 ng/ μ L) pour un volume final de 12 μ L pendant 5 min à 65°C puis 2 min à 4°C. Un mélange contenant 4 μ L de tampon RT 5X, 2 μ L de DTT à 0,1 M, 0,5 μ L de « RNase out » à 40 U/ μ L (Thermo Scientific, France) et 0,5 μ L d'enzyme M-MLV à 200 U/ μ L (Thermo Scientific, France) a ensuite été ajouté. L'ensemble a été placé 10 min à 25°C, puis 50 min à 37°C et enfin 5 min à 70°C afin d'obtenir des ADN complémentaires (ADNc).

| | Gènes (NCBI séquences) | Séquences des oligonucléotides (5'-3') | T°C d'hybridation (°C) | Taille (bp) |
|--------------------|-----------------------------|---|---------------------------|----------------|
| Gènes cible | NR3C1 (GR) (NM_008173.3) | F: CAAGGGTCTGGAGAGGACAA R: TACAGCTTCCACACGTCAGC | 61°C | 220 |
| | CRH (NM_205769.2) | F: GGCATCCTGAGAGAAGTCCCTC R: ACAGAGCCACCAGCAGCATG | 60°C | 128 |
| | CRH-R1 (NM_007762.4) | F: TGGTCCTGCTGATCAACTTT R: GTCTCAGATGTGGTGGATGC | 61°C | 85 |
| | CRH-R2 (NM_009953.3) | F: GGGCATCACCTACATGCTC R: CAAAGAAACCTGGAAGGAC | 62°C | 107 |
| | 11β-HSD1 (NM_008288.2) | F: TGCTTATTCTAAACCACATCAC R: TCTGCTTCAGCATGGCAAGGC | 61°C | 139 |
| | 11β-HSD2 (NM_008289.2) | F: GGTTGTGACACTGGTTTTG R: GTGGCCAGCACCGTGAAGCCC | 61°C | 71 |
| | S100A9 (NM_009114.2) | F: CACAGTTTGCAACTTTATGAA R: GGTCTCCATGATGTCATTTATG | 61°C | 69 |
| | IL-1β (NM_008361.4) | F: TTGACGGACCCAAAAGATG R: AGAAGGTGCTCATGTCCTCA | 62°C | 203 |
| | IL-2Rα (NM_008367.3) | R: TCCCATGACAAATCGAGAAA F: CTCCTGCAGTGACCTGTAA | 62°C | 129 |
| | FasL (NM_010177.4) | F: TCCGTGAGTTCACCAACCAA R: GGGGGTCCCTGTAAATGGG | 60 | 99 |
| Gènes de référence | Ppia (NM_008907.1) | F: GTCTCCTTCGAGCTGTTTGC R: GCGTGTAAGTCACCACCCT | 58°C | 150 |
| | Eef2 (NM_007907.2) | F: GTGGTGGACTGTGTCTGG R: CGCTGGAAGGTCTGGTAGAG | 58°C | 158 |
| | Eif3f (NM_025344.2) | F: CATCAAGGCCTATGTCAGCA R: GTGGTGGACTGTGTCTGG | 61°C | 117 |

Tab 1 : Oligonucléotides et conditions utilisés pour les RTqPCR

Séquences des couples d'oligonucléotides utilisés pour les gènes de référence et pour les gènes cible. Des couples d'oligonucléotides ont en plus été achetés chez Qiagen pour le CRH-R1 (n° catalogue : QT00106232) et le CRH-R2 (n° catalogue : QT00151543) afin de vérifier la présence des ADNc des CRH-R1 et CRH-R2 dans les L_B. Les couples d'oligonucléotides de chez Qiagen sont fournis pour fonctionner à 60°C.

7 – PCR quantitative en temps réel (qPCR)

Les analyses de PCR quantitative en temps réel (qPCR) ont été réalisées sur une machine « Realplex² mastercycle » (Eppendorf, France) et ont permis d'évaluer les variations d'expression de différents marqueurs tels que les récepteurs aux glucocorticoïdes (NR3C1 ou GR), la CRH, le CRH-R1 ou encore les 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2 (Tab 1). En plus des couples d'oligonucléotides cités dans le tableau, des couples d'oligonucléotides achetés chez Qiagen ont également été utilisés pour le CRH-R1 (n° catalogue : QT00106232) et pour le CRH-R2 (n° catalogue : QT00151543) afin de confirmer les résultats obtenus avec nos oligonucléotides. Les deux couples d'oligonucléotides mis au point par Qiagen fonctionnent à une température d'hybridation de 60°C.

Pour chaque ARNm analysé, 1,5 μ L d'ADNc a été déposé dans un mélange contenant 7,5 μ L de mix « qPCR 2X Takyon » (Eurogentec, Belgique), 1,5 μ L d'amorce sens à 1 μ M, 1,5 μ L d'amorce antisens à 1 μ M (Eurogentec, Belgique) et 3 μ L d'H₂O up.

Pour chaque marqueur, l'efficacité d'amplification a été évaluée et la normalisation a été faite avec 3 gènes de référence (Eef2, Eif3f et Ppia) dont la stabilité a été vérifiée pour chaque analyse, grâce à la feuille de calcul Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004).

8 – Extraction sur gel d'agarose et séquençage

Les analyses après qPCR et la migration d'aliqots sur gel d'agarose-BET de produits des PCR pour les CRH-R1 et CRH-R2 ont révélé à chaque fois un produit d'amplification unique. Ces aliqots provenant d'ADNc de L_B purifiés et d'hippocampe (témoin positif) ont donc pu être extraits sur des colonnes d'affinité grâce au kit « NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel, France). Pour se faire, les produits d'amplification ont été mélangés avec un tampon « NT1 » puis chaque produit a été déposé sur une colonne d'affinité. La colonne a ensuite été centrifugée à 11000 g pendant 30 sec à température ambiante. Puis, 2 lavages ont été réalisés avec 700 μ L de tampon de lavage « NT3 » suivis après chaque lavage d'une centrifugation à 11000 g pendant 30 sec à température ambiante. Suite au dernier lavage, une étape de centrifugation de la colonne, à vide, à 11000 g pendant 1 min à

température ambiante a été réalisée pour éliminer toute trace de tampon de lavage. Après avoir changé le tube collecteur, 20 µL d'un tampon d'éluion « NE » a été déposé sur la colonne. Après une incubation d'une minute à température ambiante, la colonne a été centrifugée à 11000 g pendant 1 min à température ambiante pour récupérer les produits d'amplification. Ces derniers ont été dosés au Nanodrop (Thermo Scientific, France) puis envoyés à séquencer (GATC biotech, France) par l'intermédiaire de la « plateforme de génomique et transcriptomique » de Nancy (UMR 7365, ImoPa équipe 1, France). Les séquences obtenues ont ensuite été alignées avec le logiciel NCBI/Blast afin de vérifier leurs spécificités.

9 – Puce « phospho MAPKs proteome arrays »

Les voies de signalisation potentiellement activées après stimulation des L_B par la CRH (cf : 6.3) ont été étudiées à l'aide du kit « Human Phospho-MAPK array kit » (R&D Systems, Biotechne, France).

Sur les membranes contenues dans le kit, sont fixés des Ac dirigés contre différentes protéines phosphorylées connues pour intervenir dans différentes voies de signalisation. La première étape a consisté à réhydrater puis à bloquer ces membranes pendant 1h à température ambiante sous agitation grâce à une solution de blocage fournie dans le kit. En parallèle, 150 µg de protéines provenant de L_B purifiés ont été incubés 1h à température ambiante avec un cocktail d'Ac fourni également dans le kit. Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C sous agitation avec le mélange « protéines de L_B/cocktail d'Ac ». Après 4 lavages successifs pendant 10 min à température ambiante sous agitation, de la HRP couplée à la streptavidine diluée au 1/200^{ème} dans du tampon de blocage a été ajoutée sur les membranes pendant 30 min à température ambiante sous agitation. Après 4 lavages de 10 min à température ambiante, une solution de révélation a été déposée sur les membranes permettant de visualiser le marquage grâce à l'imageur « Fusion FX-7 » (Vuilber Lourmat, France). Le marquage a ensuite été quantifié par analyse densitométrique avec le logiciel ImageJ®.

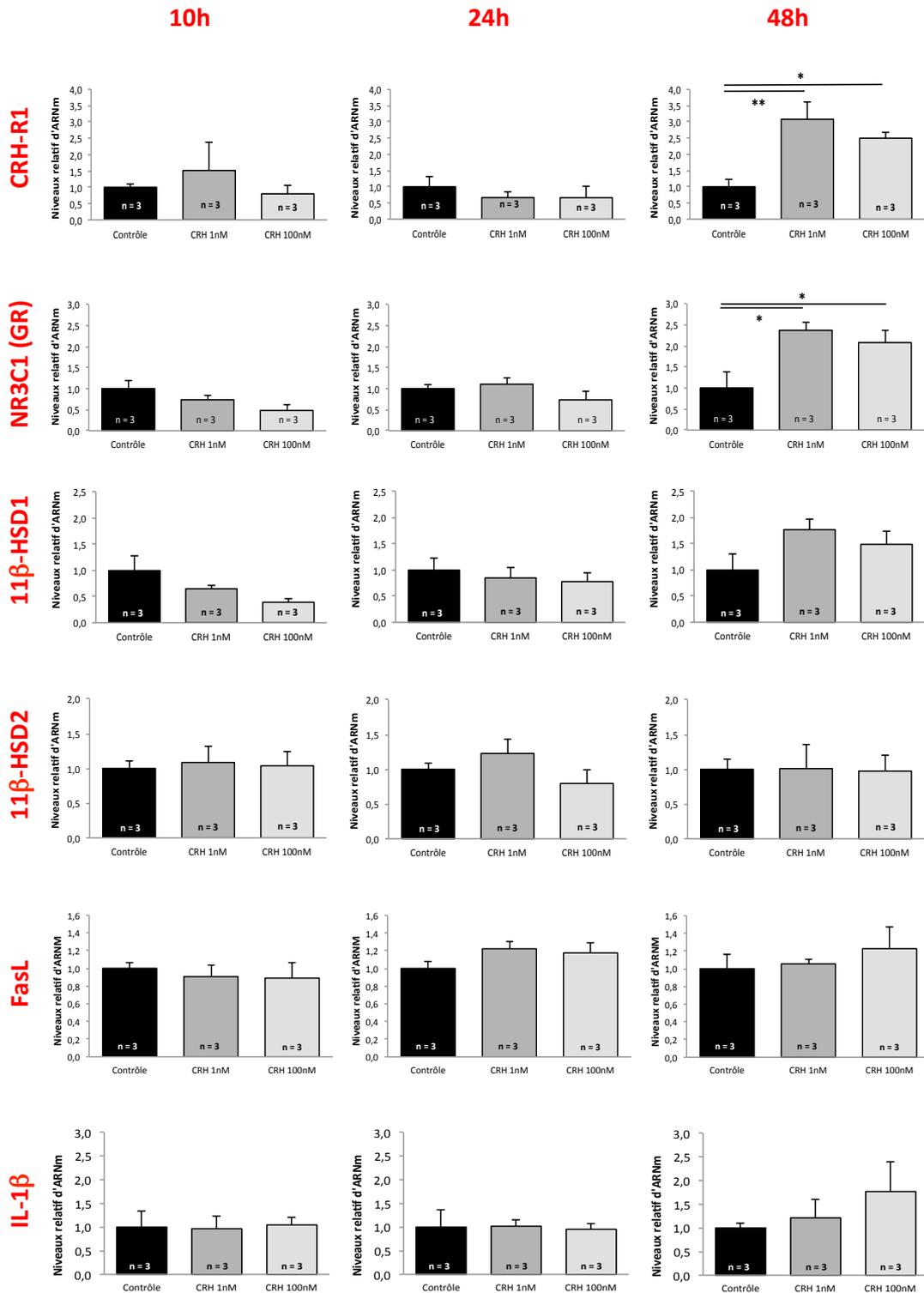


Fig 34 : Impact de la CRH sur les splénocytes murins

Cinétique de stimulation de splénocytes murins avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM pendant 10h, 24h et 48h. Variation de l'expression des ARNm de **A)** CRH-R1, **B)** GR, **C)** 11β-HSD1, **D)** 11β-HSD2, **E)** FasL, **F)** IL-1β.

10 – Analyses statistiques

Pour toutes les études réalisées, l'homogénéité de la distribution des variances a été vérifiée avec le test de Levene (fichier Anastats, <http://www.anastats.fr/outils.php>). Dans le cadre d'une distribution homogène des variances, la comparaison des groupes a été réalisée par un test Anova suivi d'une comparaison deux à deux par un test de PLSD de Fisher. Si l'homogénéité des variances n'était pas vérifiée, un test de Kruskal-Wallis a alors été utilisé pour comparer les différents groupes, suivi d'une comparaison deux à deux par un test de Mann-Whitney. Ces différents tests ont été réalisés avec le logiciel Statview®. Pour l'ensemble des études, le seuil de significativité a été déterminé pour une valeur de $p < 0,05$.

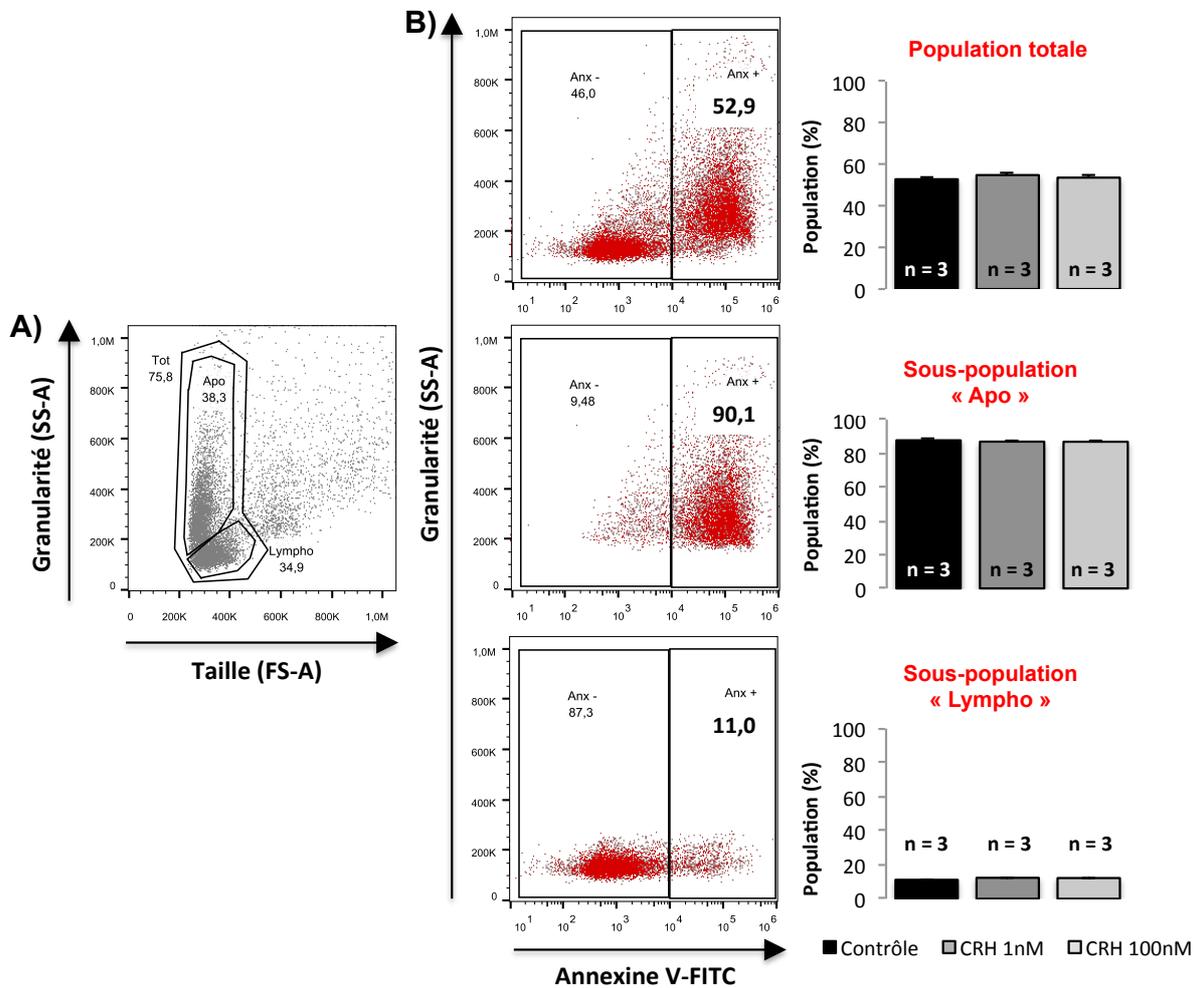


Fig 35 : Etude de la viabilité cellulaire des splénocytes murins après stimulation avec de la CRH

Analyse par cytométrie en flux (FACS) de splénocytes murins cultivés *in vitro* avec 1 nM ou 100 nM de CRH pendant 48h. **A)** Distinction de deux sous-populations cellulaires nommées « Apo » et « Lympho » en fonction leur taille (FS-A) et de leur granularité (SS-A). **B)** Analyse par FACS du marquage annexine V confirmant la distinction entre les deux sous-populations « Apo » et « Lympho ».

VI – Résultats et discussion pour la partie immunologie

1 – Impact de la CRH sur les splénocytes murins : baisse de la viabilité des lymphocytes B

1.1 – Effet de la CRH sur la viabilité et la production de cytokines des splénocytes murins

Afin d'évaluer l'impact que peut avoir la CRH sur la viabilité et la production de cytokines des splénocytes murins, des études *in vitro* ont été réalisées. Des splénocytes murins ont été incubés avec de la CRH à 1 nM et 100 nM pendant 10h, 24h et 48h. Suite à ces stimulations, des analyses par qPCR ont été réalisées afin d'évaluer l'effet de la CRH sur l'expression de différents marqueurs à savoir le CRH-R1, les GR, les 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2, le ligand de Fas (FasL), ainsi que l'IL-1 β (Fig 34). Aucune variation n'est observée après 10h et 24h d'incubation avec la CRH et ce, pour tous les marqueurs étudiés. A partir de 48h d'incubation avec la CRH, une augmentation d'environ 250% du niveau d'expression des ARNm du CRH-R1 ($F(2) = 9,58$; $p < 0,05$) et d'environ 200% du niveau d'expression des ARNm des GR ($F(2) = 5,81$; $p < 0,05$) est observée après stimulation avec la CRH à 1 et 100 nM. La CRH ayant été décrite comme pouvant avoir une action pro-inflammatoire, nous avons choisi d'étudier le niveau d'expression d'un marqueur de l'inflammation, à savoir l'IL-1 β . Une légère augmentation du niveau d'ARNm de l'IL-1 β , non significative, est observée après 48h de stimulation avec la CRH. Ces études ne montrent aucune variation du niveau des transcrits du ligand de Fas (FasL), ni de ceux des 11 β -HSD1 et 11 β -HSD2.

D'après les analyses par qPCR, le point de cinétique à 48h semble être intéressant pour étudier l'impact de la CRH sur les splénocytes murins. Des analyses par cytométrie en flux ont donc été réalisées après 48h d'incubation avec la CRH à 1 ou 100 nM afin de savoir si la CRH influe sur les différentes populations spléniques, notamment sur les lymphocytes. Lors de ces analyses, deux sous-populations de cellules ont pu être définies en fonction de leurs tailles (FS-A) et de leurs granularités

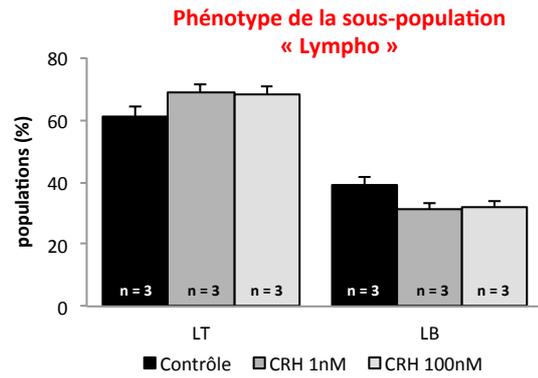
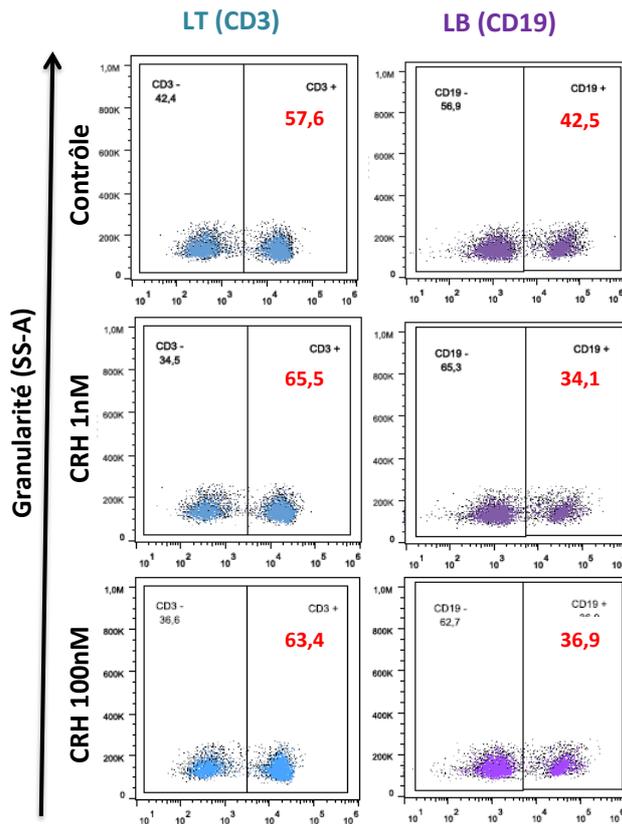


Fig 36 : Variations des populations lymphocytaires spléniques murines après stimulation à la CRH

Etude, par FACS des populations lymphocytaires T (CD3⁺) et B (CD19⁺) spléniques après 48h de stimulation avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM.

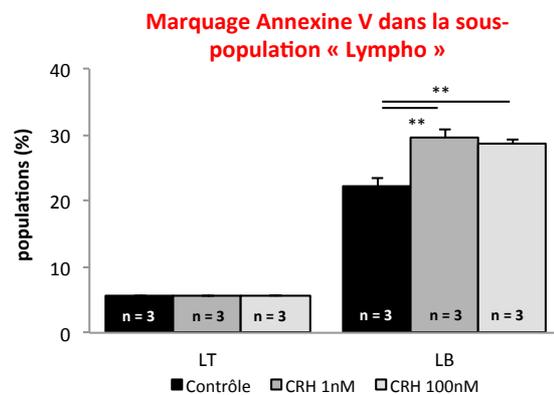
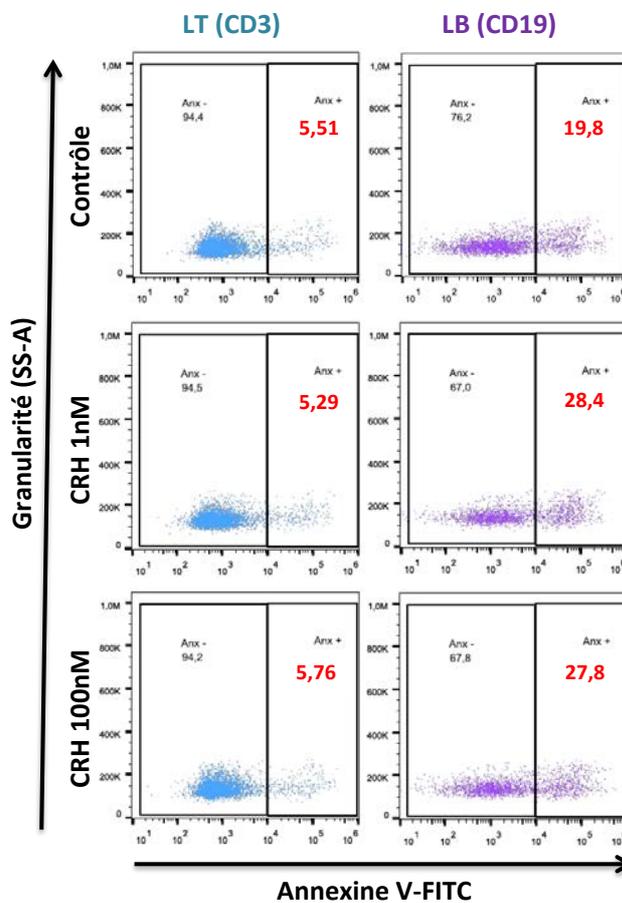


Fig 37 : Analyse de la viabilité cellulaire des lymphocytes (L_T et L_B) spléniques murines après stimulation à la CRH

Marquage à l'annexine V des splénocytes stimulés *in vitro* pendant 48h avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM. Analyse, par FACS, de la sous-population « Lympho » par FACS.

(SS-A), et ce, quelque soit les conditions de culture (avec ou sans CRH), (Fig 35a). La première sous population, constituée de cellules de petite taille avec une forte granularité, correspond aux cellules en cours de mort cellulaire. Pour cette étude, cette sous-population a été nommée « Apo ». La seconde sous-population, comprenant des cellules de taille plus importante avec une faible granularité, correspond aux cellules viables. Cette sous-population a été nommée « Lympho ». Cette distinction entre ces deux sous-populations a été confirmée par marquage à l'annexine V, marqueur de mort cellulaire (Fig 35b). Environ 90% des cellules de la sous-population « Apo » sont marquées positivement à l'annexine V, contre seulement 10% des cellules de la sous-population « Lympho ». Ceci confirme le fait que les cellules de la sous-population « Apo » sont principalement en voie de mort cellulaire alors que les cellules de la sous-population « Lympho » sont majoritairement vivantes.

L'analyse du marquage à l'annexine V sur la totalité des lymphocytes, montre que ce marquage ne semble pas varier en fonction des traitements à la CRH. En effet, avec ou sans traitement à la CRH, près de 50% des lymphocytes sont marqués positivement à l'annexine V. Toutefois, en regardant plus en détail les cellules de la sous-population « Lympho », les analyses montrent que le traitement à la CRH entraîne une altération, non significative, des proportions de L_T ($CD3^+$) par rapport aux L_B ($CD19^+$) et ce, en faveur des L_T (Fig 36). En effet, sans traitement à la CRH, la sous-population « lympho » se compose d'environ 60% de L_T et de 40% de L_B . Après 48h de stimulation avec la CRH à 1 ou 100 nM, les proportions cellulaires passent à près de 70% de L_T pour 30% de L_B .

Afin de savoir si cette altération du ratio L_T/L_B induite par la CRH est la conséquence d'une augmentation de la population de L_T ou d'une diminution des L_B voire des deux phénomènes à la fois, des analyses plus précises du marquage annexine V ont été faites pour chacune de ces populations cellulaires (Fig 37). Ces analyses révèlent que le pourcentage de L_T marqués positivement à l'annexine V est relativement faible et qu'il ne varie pas au sein de la sous-population « lympho ». Que ce soit pour la condition « contrôle » ou « traitement avec la CRH », le pourcentage de L_T marqués positivement avec l'annexine V reste aux alentours de 5%. En ce qui concerne la population de L_B , le pourcentage de cellules marquées positivement avec l'annexine V augmente de près de 10% entre la condition « contrôle » et les splénocytes traités avec 1 ou 100 nM de CRH pendant 48h, ($F(2) = 16,22$; $p < 0,01$).

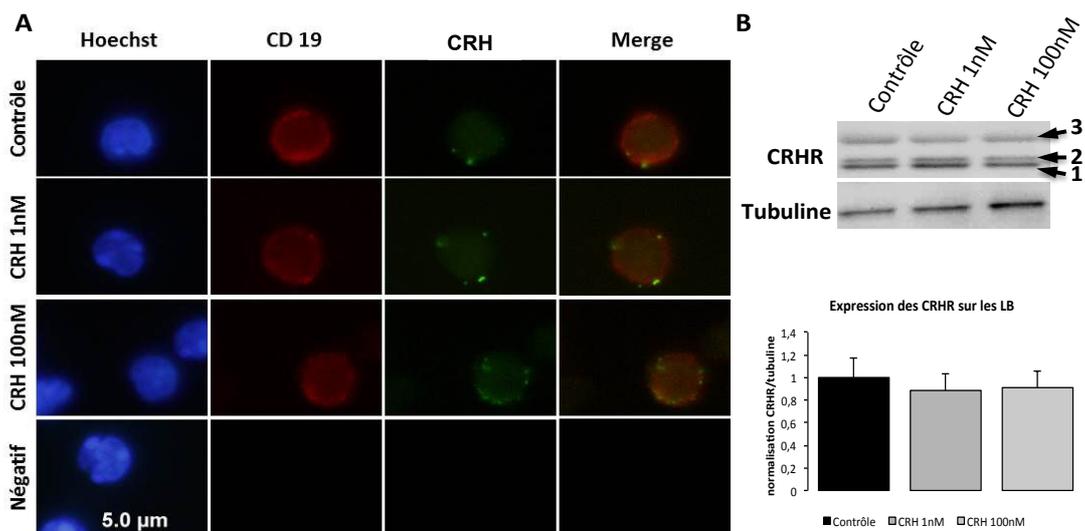


Fig 38 : Expression des récepteurs à la CRH (CRHR) à la surface des L_B
 Splénocytes stimulés *in vitro* pendant 48h avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM. **A)** Marquage par immunofluorescence des CRHR à la surface des L_B (CD19⁺). Photos représentatives d'une expérience répétée trois fois de manière indépendante. **B)** Mise en évidence, par western blot (WB) de la présence de CRHR au niveau des L_B purifiés. 1,2 - deux isoformes du CRHR ; 3 - isoforme fortement glycosylée

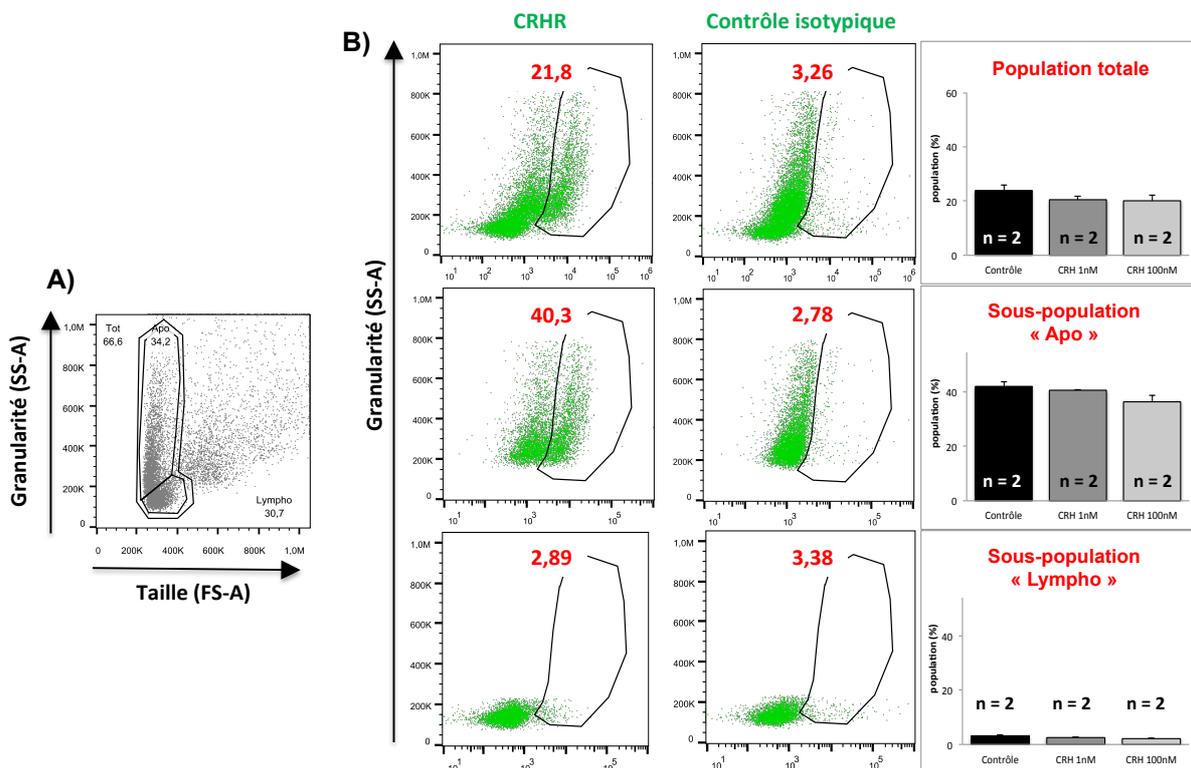


Fig 39 : Expression des récepteurs à la CRH (CRHR) à la surface des L_B
 Etude par FACS de la présence des CRHR à la surface des L_B purifiés à partir de splénocytes stimulés pendant 48h avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM en fonction de leur viabilité. **A)** Distinction de deux sous-populations « Apo » et « Lympho », en fonction de leur taille (FS-A) et de leur granularité (SS-A) au niveau des L_B purifiés. **B)** Etude de la présence des CRHR sur les L_B au niveau des sous-populations « Apo » et « Lympho ».

Plus précisément, seulement 20% des L_B de la sous-population « Lympho » sont marqués positivement à l'annexine V dans la condition contrôle contre 30% de ces cellules après 48h de traitement à la CRH. Il semble donc que la CRH affecte la viabilité des L_B spléniques, sans pourtant autant altérer la viabilité des L_T.

1.2 – Expression du CRH-R sur les L_B murins

Suite aux résultats obtenus avec les cultures de splénocytes stimulés à la CRH, des analyses plus approfondies ont été réalisées afin de comprendre si l'effet observé sur les L_B était un effet direct ou indirect de la CRH. En effet, aucune publication ne mentionnant la présence de récepteurs à la CRH (CRH-R) à la surface des L_B, la question d'une action directe de la CRH se pose. Dans un premier temps, nous avons donc vérifié la présence de ces récepteurs à la surface de ces cellules. Pour cela, des splénocytes ont été cultivés pendant 48h avec 1 nM ou 100 nM de CRH, suivi d'une purification des L_B par sélection négative. Après purification, une vérification systématique de la pureté des échantillons a été faite par cytométrie en flux. La pureté des L_B obtenus est comprise entre 92 et 97%.

A partir de ces échantillons de L_B purifiés, des analyses par western blot ont révélé la présence de CRH-R (Fig 38b). Le profil obtenu pour le marquage CRH-R montre 3 bandes. Deux bandes pourraient correspondre à deux isoformes des récepteurs aux alentours de 48kDa et la troisième bande serait la forme glycosylée des CRH-R aux alentours de 70kDa. Après 48h de stimulation avec de la CRH, il ne semble pas y avoir de variation d'expression dans les isoformes observées en western-blot. L'expression des CRH-R par les L_B murins a été confirmée par un co-marquage avec des Ac anti-CD19 et des Ac anti-CRH-R en immunofluorescence réalisé sur des splénocytes stimulés, ou non, *in vitro* avec de la CRH à 1 nM ou 100 nM pendant 48h (Fig 38a).

Afin de savoir si la totalité ou si seulement une partie des L_B spléniques exprime ces récepteurs à la CRH, des études par cytométrie en flux ont été réalisées. Comme pour les splénocytes totaux, nous retrouvons les deux sous-populations « Apo » et « Lympho ». En analysant la population globale des L_B, il apparaît que seulement 20 à 25% des L_B sont marqués positivement au CRH-R. Afin de savoir si certaines sous-

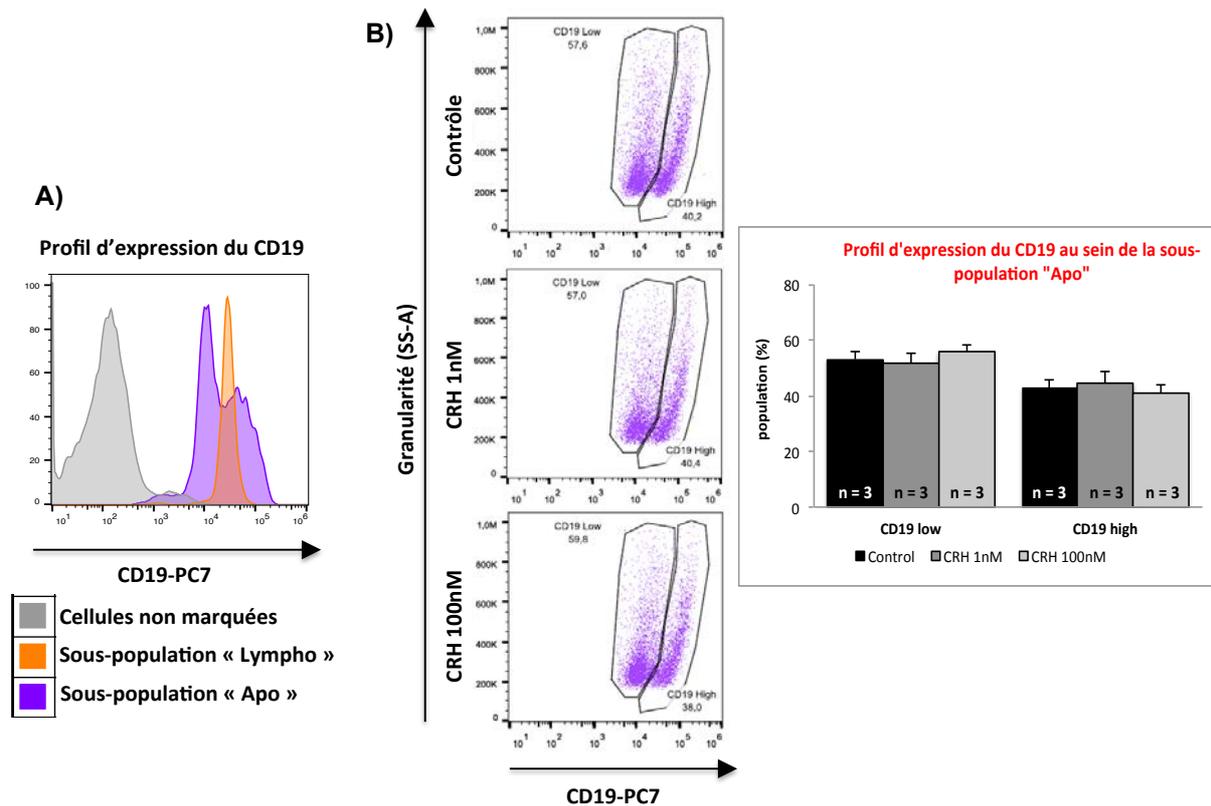


Fig 40 : Profil d'expression du CD19 à la surface des L_B

Distinction de trois profils d'expression du marqueur CD19 à la surface des L_B par analyse en FACS. **A)** Profils d'expression du CD19 au sein de la sous-population « Lympho » (en orange), avec un niveau d'expression intermédiaire ($CD19^{int}$) et de la sous-population « Apo » (en violet) avec une expression faible ($CD19^{low}$) et une expression plus forte ($CD19^{high}$). **B)** Analyse des profils $CD19^{low}$ et $CD19^{high}$ de la sous-population « Apo » en fonction des traitements à la CRH pendant 48h.

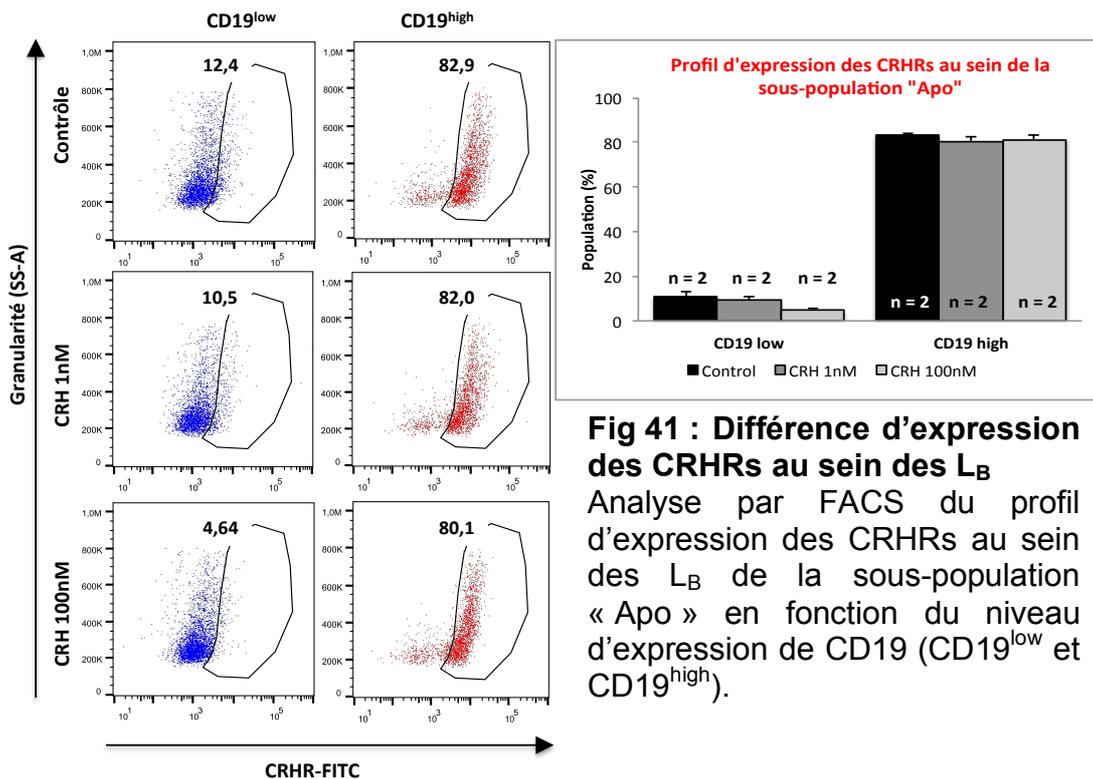


Fig 41 : Différence d'expression des CRHRs au sein des L_B

Analyse par FACS du profil d'expression des CRHRs au sein des L_B de la sous-population « Apo » en fonction du niveau d'expression de CD19 ($CD19^{low}$ et $CD19^{high}$).

populations de L_B expriment ou non ces CRH-R, des analyses plus approfondies ont été faites au niveau des sous-populations « Apo » et « Lympho » (Fig 39).

Ces analyses n'ont révélé aucun marquage de CRH-R au niveau des L_B de la sous-population « Lympho », alors que près de 35 à 40% des L_B de la sous-population « Apo » expriment ces CRH-R. Notre analyse s'est donc focalisée ensuite sur cette sous-population « Apo ». En regardant un peu plus en détail cette sous-population de L_B, deux phénotypes particuliers se dessinent en fonction du profil d'expression du marqueur CD19. Environ 60% des L_B de la sous-population « Apo » expriment faiblement le CD19 (CD19^{low}) alors que près de 40% de ces L_B l'expriment fortement (CD19^{high}) (Fig 40). Ces deux profils se distinguent du profil d'expression des L_B de la population « Lympho » qui ont un niveau d'expression de CD19 intermédiaire (CD19^{int}). Au cours de cette analyse, aucun L_B ayant un profil CD19^{int} n'a été identifié dans la population « Apo ».

Après avoir défini ces deux profils de cellules CD19^{low} et CD19^{high} au sein de la sous-population « Apo » des L_B, leur profil d'expression des CRH-R a été établi. Les résultats obtenus indiquent que les L_B CD19^{low} n'expriment pas ou peu les CRH-R alors que près de 80% des L_B CD19^{high} expriment les CRH-R (Fig 41). Il est à noter qu'aucune variation d'expression de ces récepteurs n'a pu être mise en évidence avec le traitement à la CRH, dans les conditions de culture utilisées.

Les études réalisées au cours de ce projet ont donc permis de montrer la présence de CRH-R à la surface des L_B spléniques murins avec trois techniques différentes (western blot, immunofluorescence et FACS). De plus, nous montrons que tous les L_B n'expriment pas ces récepteurs. Il semble que seuls les L_B en cours de mort cellulaire les expriment.

Pour ces trois études, l'Ac utilisé ne nous a pas permis de déterminer si ces CRH-R correspondaient au CRH-R1 et/ou au CRH-R2 car l'Ac reconnaît ces deux récepteurs. Donc, pour savoir quel(s) récepteur(s) est/sont exprimés, des qPCR ont été réalisées avec différents couples d'oligonucléotides spécifiques du CRH-R1 et du CRH-R2 sur des ADNc de L_B purifiés provenant de rate de souris. Nous avons utilisé comme contrôle positif d'amplification de l'ADNc d'hippocampe car ce tissu exprime les 2 types de récepteurs à la CRH. Avec les ADNc de L_B purifiés, nous n'avons pu amplifier que du CRH-R2, ce qui laisse à penser que les L_B spléniques n'expriment que ce récepteur (Fig 42). Les produits d'amplification (obtenus à partir du contrôle

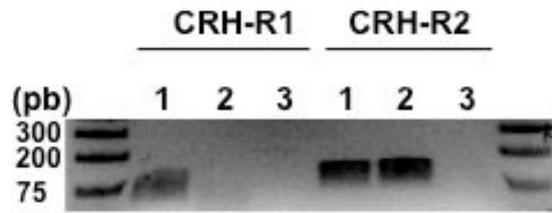


Fig 42 : Expression des ARNm des CRH-R1 et CRH-R2 au sein des L_B spléniques murins
 Etudes par qPCR. Amplification du CRH-R1 (85pb) et du CRH-R2 (107pb)
 1 – Témoin positif (hippocampe) ; 2 – Lymphocytes B purifiés ; 3 – Contrôle négatif.

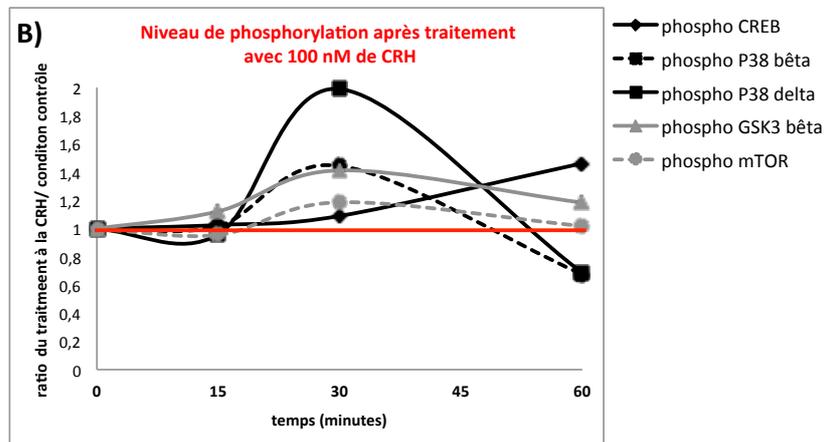
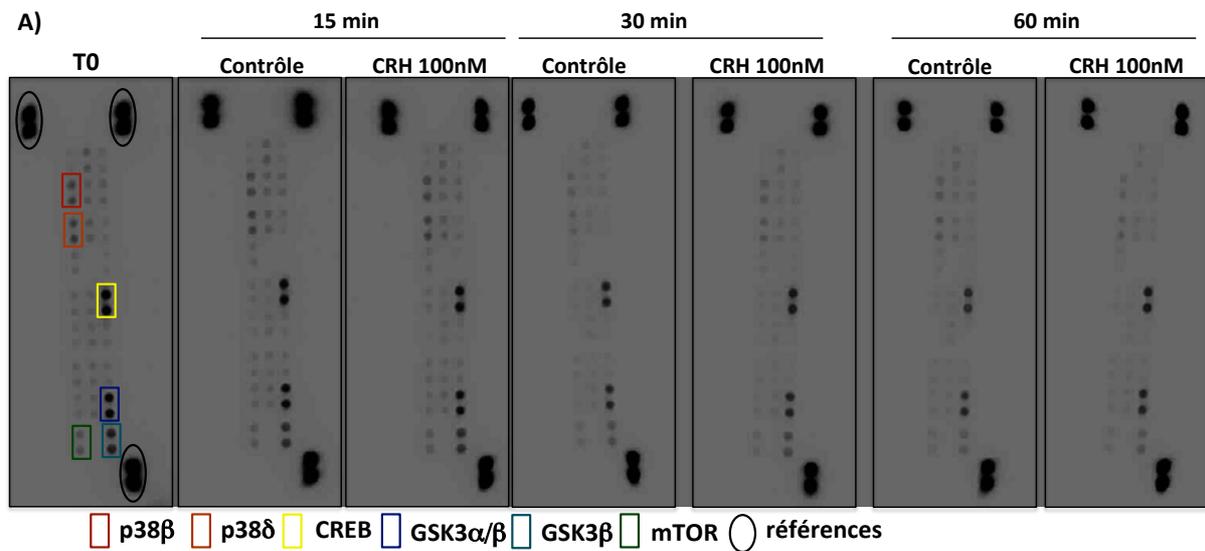


Fig 43 : Voies de signalisation activées dans les L_B spléniques murins après stimulation avec de la CRH à 100 nM pendant différents temps

A) Photos des « proteomes arrays » réalisés à partir d'une cinétique de stimulation des LB avec de la CRH à 100nM pendant 15 min, 30 min et 1h. **B)** Normalisation des niveaux de phosphorylation de CREB, P38 δ , P38 β , GSK3 β et mTOR suite à la stimulation à la CRH 100 nM comparé aux niveaux de phosphorylation des conditions contrôles de chaque temps de cinétique (L_B non stimulés avec la CRH). Trait rouge : normalisation du niveau de phosphorylation de la condition contrôle.

positif et des L_B purifiés) ont été séquencés. L'analyse des séquences obtenues avec NCBI/Blast a démontré que les amplicons obtenus à partir des ADNc d'hippocampe, correspondent bien respectivement à du CRH-R1 et du CRH-R2. L'unique amplicon obtenu à partir des ADNc de L_B purifiés correspondait à du CRH-R2. Les L_B purifiés à partir de la rate de souris n'expriment donc que du CRH-R2.

1.3 – Voie(s) de signalisation activée(s) par la CRH sur les L_B

Les L_B exprimant du CRH-R2 à leur surface, la possibilité d'un effet direct de la CRH sur ces cellules est donc maintenant envisageable. En effet, bien que l'affinité de la CRH soit plus faible pour le CRH-R2 que pour le CRH-R1, le CRH-R2 peut tout de même fixer la CRH dans des conditions physiologiques.

Afin de déterminer les voie(s) de signalisation activées par la CRH, des L_B spléniques purifiés, dont la pureté a été vérifiée par cytométrie en flux, ont été stimulés avec de la CRH à 100 nM sur des temps courts de 15 min, 30 min et 1h. Ensuite, une analyse globale par « proteome arrays » ciblant les voies de signalisation phospho-MAPK a été réalisée (Fig 43a). Le « proteome arrays » utilisé pour ces analyses cible les MAPK humaines car il n'existe malheureusement pas encore d'équivalent pour la souris à ce jour. Toutefois, d'après le fournisseur, bon nombre des cibles de ce « proteome arrays » fonctionnent avec les protéines de souris. L'analyse de cette étude n'a pas mis en évidence d'activation des voies phospho-MAPK au niveau des L_B après 15 min de stimulation à la CRH. Après 30 min de stimulation, nous observons une légère augmentation d'environ 19% du niveau de phosphorylation de mTOR ainsi qu'une augmentation de phosphorylation de 43% pour GSK3 β et de 45% pour p38 β . Une augmentation plus importante de 98% du niveau de phosphorylation de la protéine p38 δ est également observée après 30 min de stimulation avec de la CRH. Une autre voie de signalisation, la voie AMPc/PKA/CREB, connue pour être stimulée par la CRH, semble s'activer mais plus tardivement que les cibles vues précédemment avec une augmentation d'environ 46% du niveau de phosphorylation de CREB après 1h de stimulation (Fig 43b).

1.4 - Discussion

De nos jours, nous sommes de plus en plus soumis à différents facteurs de stress (physiques et/ou psychologiques) au quotidien. Ces facteurs de stress, qui peuvent être liés à la vie professionnelle ou personnelle, sont la cause d'une forte augmentation du nombre de personnes anxieuses ou dépressives pouvant aller jusqu'au « burn out ». De nombreuses études ont déjà montré qu'une exposition à un stress chronique entraînait un affaiblissement du SI, notamment de la réponse immunitaire spécifique (Godbout and Glaser, 2006). C'est pourquoi, l'étude et la compréhension de l'impact d'un stress chronique sur le SI revêtent une importance majeure.

Bien que les glucocorticoïdes puissent agir sur le SI, il s'avère que la CRH peut également jouer un rôle direct sur les différentes cellules immunitaires qui expriment à leur surface des récepteurs à la CRH (CRH-R1 et/ou CRH-R2). Son action directe sur l'immunité est de plus en plus étudiée car elle présente sans doute une importance majeure et les études réalisées permettront vraisemblablement de mieux comprendre les mécanismes pouvant entraîner cet affaiblissement du SI.

Au cours de ce projet, nous avons dans un premier temps stimulé des splénocytes avec de la CRH à 1 nM et 100 nM sur des temps de 10, 24 et 48h. Le choix de ces concentrations s'est fait en fonction de la littérature. Lors d'un stress, il a été montré que la CRH pouvait atteindre une concentration de 100-200 nM au niveau de l'hypothalamus, de l'amygdale et de l'hippocampe (Maras and Baram, 2012). L'équipe de Dermitzaki, en 2002, a réalisé des stimulations de la lignée cellulaire PC12 avec des concentrations de CRH allant de 10^{-12} M (1 pM) à 10^{-6} M (1 μ M) pendant 24h, 72h et 120h. Cette étude a mis en avant une induction d'apoptose dose-dépendante des cellules PC12 après trois jours de stimulation à la CRH. Une autre étude a été réalisée afin d'évaluer l'impact de la CRH sur la maturation d'ovocytes murins. Pour cela, différentes doses de CRH allant de 10^{-11} M à 10^{-6} M ont été utilisées. Une inhibition de la maturation de certains stades ovocytaires a été observée à partir d'une concentration de 10^{-9} M de CRH (soit 1 nM), (Kiappekou et al., 2011). Nous avons donc choisi d'utiliser des concentrations de CRH de 1 et 100 nM afin de voir si un effet dose-dépendant pouvait être observé. Pour les temps d'incubation choisis, différentes études ont évalué l'effet de la CRH après 48h de stimulation, c'est pourquoi nous avons choisi ce point de cinétique. Nous avons

également choisi des points de cinétique à 10h et 24h afin de voir si la CRH pouvait avoir des effets plus précoces sur les splénocytes. Des points de cinétique plus tardifs (72h et 96h) ont aussi été testés mais nos cellules primaires n'étant pas activées, le taux de mortalité a été trop important et ne nous a donc pas permis de poursuivre. Nous avons donc abandonné ces temps tardifs pour nous focaliser sur les trois temps de cinétique retenus, à savoir 10h, 24h et 48h.

Suite à ces études, nous avons mis en évidence qu'une stimulation des splénocytes murins avec de la CRH entraîne une augmentation du niveau de transcrits des GR. Ce résultat particulièrement intéressant pourrait suggérer que la CRH potentialise les effets des glucocorticoïdes sur le SI, en augmentant la sensibilité des cellules aux glucocorticoïdes grâce à l'augmentation d'expression de ses récepteurs. Ce résultat et cette hypothèse peuvent être étayés par certaines études qui montrent, notamment sur le SNC, que des co-stimulations CRH/glucocorticoïdes entraînent des effets plus importants que de simples stimulations avec la CRH ou avec des glucocorticoïdes³. Il est donc envisageable que ces deux substances puissent agir en synergie au niveau du SI.

Cette étude a aussi permis de montrer une augmentation, non significative, de l'expression des ARNm de l'IL-1 β suite aux stimulations avec la CRH. L'effet pro-inflammatoire de la CRH a déjà été décrit sur les cellules du système immunitaire mais les cellules avaient été stimulées avec du LPS au préalable (Agelaki et al., 2002). Dans notre étude, les cellules n'ont pas été pré-activées, ce qui peut expliquer la différence entre les résultats. Néanmoins, le fait d'observer cette légère augmentation conforte l'idée que la CRH peut avoir une action pro-inflammatoire directe sur le SI.

En plus d'une éventuelle action conjointe avec les glucocorticoïdes, nous avons montré au cours de ce projet que la CRH pouvait avoir une action directe et indépendante de l'action des glucocorticoïdes sur le SI. En effet, nos études montrent que la CRH peut induire, *in vitro*, une mortalité cellulaire des lymphocytes spléniques. Ceci est particulièrement intéressant car cette mortalité semble être induite uniquement chez les L_B sans affecter la viabilité des L_T. Ce résultat peut paraître étonnant car il a déjà été montré que la CRH pouvait induire l'apoptose des

³ Travaux non publiés, présentés sur poster lors d'un congrès de la « society for neurosciences » (SFN) : http://contecenter.uci.edu/wp-content/uploads/contecenterPoster_YC2015.pdf

L_T , notamment lors de la période de gestation. Toutefois, cette apoptose est induite uniquement sur des L_T activés, présents au niveau tissulaire (utérus) et dans la circulation sanguine (Kalantaridou et al., 2007). Dans le cadre de notre projet, les cellules restent naïves, elles ne sont pas activées et elles proviennent de la rate. Cela peut expliquer le fait que la viabilité des L_T ne soit pas affectée par la CRH lors de nos études. Ces différents résultats montrent bien que le microenvironnement et l'état d'activation des cellules sont deux paramètres très importants pour comprendre l'action de la CRH. Ce qui est particulièrement intéressant à propos de l'action de la CRH sur les L_B spléniques, c'est que la rate est une zone de maturation des L_B lors d'une infection. De plus, les L_B sont les seules cellules capables de produire des Ac, acteurs principaux de la réponse humorale or, cette réponse est souvent affectée lors d'un stress. Il se pourrait donc que la CRH joue un rôle non négligeable sur l'affaiblissement du SI lors d'un stress par le biais de son action sur les L_B .

La découverte de CRH-R2 à la surface des L_B indique que la CRH peut agir directement sur ces cellules. Bien que la CRH ait une affinité plus forte pour le CRH-R1, elle peut tout de même se fixer sur le CRH-R2. Des études ont montré notamment au niveau de la vessie et de l'hippocampe que la CRH pouvait agir via le CRH-R2 (Boucher et al., 2010; Chen et al., 2012c). L'activation du CRH-R2 par la CRH a également été mise en évidence sur la lignée cellulaire de monocyte humain THP-1 (Chandras et al., 2009). Il est donc tout à fait possible que la CRH agisse directement sur les L_B via le CRH-R2.

Toutefois, d'après les résultats de cytométrie en flux, seuls 20% des L_B de la rate expriment ces CRH-R2. Dans la rate, deux grandes sous-populations de L_B ont été identifiées : les sous-populations B1 et B2. Le fait que tous les L_B spléniques ne semblent pas exprimer les CRH-R2, pose la question de la présence exclusive ou non de ce récepteur sur l'une ou l'autre de ces sous-populations. Pour la suite de ce projet, il serait donc intéressant d'affiner encore un peu plus les résultats obtenus en discriminant l'expression du CRH-R2 en fonction des sous-populations B1 ($CD19^+/CD43^+$) et B2 ($CD19^+/CD43^-$). S'il s'avère qu'une des deux sous-populations exprime le CRH-R2 et pas l'autre, il se pourrait que ce récepteur devienne un marqueur permettant de distinguer les deux sous-populations B1 et B2.

Une autre possibilité pourrait expliquer le fait que tous les L_B n'expriment pas ce récepteur. D'après nos résultats, seuls les L_B $CD19^{high}$ expriment les CRH-R2. Dans la littérature, la forte expression du marqueur CD19 ($CD19^{high}$) est décrite comme

étant une distinction d'une sous-population de L_B : les lymphocytes B régulateurs (B_{reg}) appelée aussi B10 car cette sous-population exprime fortement l'IL-10. Les B_{reg} sont décrits comme ayant un rôle tolérogène en inhibant la différenciation Th1 et Th17 et favorisant la différenciation T_{reg} (Qian et al., 2012; Stolp et al., 2014; Yanaba et al., 2008). Une autre possibilité serait donc que les CRH-R2 soient présents sur cette population B_{reg} .

Après avoir mis en évidence la présence de CRH-R2 à la surface des L_B spléniques murins, nous avons cherché à savoir qu'elle(s) voie(s) de signalisation était/étaient activée(s) dans ces cellules, suite à une stimulation la CRH. Les premières études, réalisées par « phosphoMAPK proteome arrays », montrent qu'une stimulation avec 100 nM de CRH entraîne une activation de la voie de signalisation AMPc/PKA/CREB. Cette augmentation du niveau de phosphorylation de CREB survient au bout de 1h. L'activation de cette voie par la CRH a déjà été décrite dans la littérature et c'est une voie connue pour jouer un rôle dans la survie cellulaire. En plus de l'activation de cette voie, une augmentation du niveau de phosphorylation de GSK3 β est observée après 30 min de stimulation par la CRH. Cette phosphorylation de la Sérine9 de GSK3 β est décrite comme étant inhibitrice, conduisant à une inactivation de GSK3 β . L'activation de la phosphorylation de GSK3 β , alors que l'on observe une induction de mortalité cellulaire au niveau des L_B , peut sembler paradoxale. Mais, après stimulation avec la CRH, cette mortalité ne s'observe que sur 10% des L_B . Cela signifie donc que 90% des L_B sont encore viables malgré la stimulation à la CRH : ces cellules pourraient donc mettre en place des mécanismes leur permettant d'échapper à la mort cellulaire. L'activation de voies de signalisation, telle que la voie AMPc/CREB/PKA, promotrices de la survie cellulaire et antagonistes à la voie apoptotique, pourrait être une possibilité.

Outre l'activation de ces différentes voies de signalisation, l'activation de p38 δ au niveau des L_B spléniques, après stimulation avec la CRH, est particulièrement intéressante. Parmi les quatre isoformes composant la famille de protéine p38, peu de choses sont connues sur le rôle de p38 δ notamment au niveau des lymphocytes. Bien que p38 δ ne soit pas la forme la plus étudiée, des études ont montré que l'activation de cette isoforme semble jouer un rôle dans l'induction de la mort cellulaire par apoptose notamment au niveau des kératinocytes ou encore au niveau

du rein (Ambrose et al., 2006; Kraft et al., 2007). De plus, une étude réalisée sur la viabilité des L_T CD4+ suite à une infection virale montre que l'inhibition de la p38 δ inhibe l'induction d'apoptose due à l'infection virale (Gutierrez-Sanmartin et al., 2008). L'activation de p38 δ peut donc jouer un rôle important dans les mécanismes d'induction de mort cellulaire, même au sein des cellules immunitaires. Il est donc envisageable que l'activation de p38 δ , au niveau des L_B en contact avec la CRH, soit à l'origine de cette induction de mort cellulaire. Une fois activée, p38 δ peut notamment entraîner l'expression de p53, connu pour être un marqueur pro-apoptotique (O'Callaghan et al., 2014).

Les analyses par western blot des voies de signalisation activées après stimulation à la CRH tendent à confirmer les résultats obtenus avec la puce protéomique. Toutefois, les légères augmentations de phosphorylation notamment de p38 ne sont pas significatives en western-blot car il s'avère que l'Ac utilisé reconnaît les quatre isoformes de p38. Il se peut donc que l'activation de p38 δ soit masquée par le signal des autres isoformes. Ceci peut également s'expliquer par le fait que seuls 20% des L_B spléniques murins expriment des récepteurs à la CRH. Il se peut donc que l'activation des voies soit masquée parmi les 80% de L_B qui ne seraient pas directement sensibles à la CRH. Il pourrait donc être intéressant de faire cette étude de signalisation directement par cytométrie en flux pour observer les voies de signalisation activées au sein des L_B exprimant les récepteurs à la CRH.

De plus, les L_B exprimant uniquement du CRH-R2, il serait intéressant de les stimuler avec de l'UCN2 ou de l'UCN3 qui se fixent sur ce récepteur et de comparer les résultats obtenus avec ceux obtenus avec la CRH.

VII – Discussion générale et perspectives

Dans le cadre des études menées pour ce projet, nous avons montré qu'en condition de stress, la CRH joue un rôle important aussi bien dans les régulations du SNC que du SI. En effet, en plus de son rôle principal dans la réponse au stress, nous avons montré que la CRH semble intervenir dans la régulation des fonctions locomotrices, notamment au niveau du cervelet. De plus, la CRH impacte directement le SI notamment en altérant la viabilité des L_B . Ces résultats montrent que l'action de la CRH ne se limite pas à la simple activation de l'hypophyse lors d'un stress. Ces résultats confirment ainsi que la CRH peut être une cible de choix pour contrer certains effets délétères observés lors d'un épisode stressant.

Un autre paramètre qui ressort de ces travaux est le fait que la CRH semble pouvoir agir en synergie avec les glucocorticoïdes. En effet, l'inhibition du CRH-R1 par l'antalarmine semble affecter les fonctions locomotrices uniquement en présence de la corticostérone. Les études *in vitro* réalisées sur le SI montrent qu'une stimulation des splénocytes avec la CRH induit une augmentation de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes. Cela suggère que la CRH potentialise les effets des glucocorticoïdes en augmentant la sensibilité des cellules à ces glucocorticoïdes. Cette hypothèse est confortée par la légère augmentation d'expression, non significative, de la 11 β -HSD1 au niveau du SI après 48h de stimulation avec de la CRH. La 11 β -HSD1 étant connue pour sa capacité à réactiver les glucocorticoïdes, il serait intéressant d'étudier cet effet synergique potentiel entre la CRH et les glucocorticoïdes aussi bien au niveau du SNC que du SI. L'action de ces deux hormones est donc interdépendante. En effet, la CRH induit la production de glucocorticoïdes et ces derniers régulent négativement la production de CRH et de ses récepteurs (activation et régulation de l'axe HHS). Pourtant à ce jour, peu d'études font référence à cette synergie d'action entre la CRH et les glucocorticoïdes. Ces deux hormones étant fortement impliquées dans le processus de réponse physiologique à un stress, il serait très intéressant de mieux caractériser cette synergie d'action.

Ces hormones agissent sur les L_B mais également sur les L_T . En effet, les glucocorticoïdes favorisent une réponse de type Th2 en induisant la production de

cytokines telles que l'IL-4, l'IL-10 ou encore l'IL-13 qui favorisent la différenciation des $L_T CD4^+$ vers la voie Th2 et inhibent la production de l'IL-12 qui favorise la voie Th1 (Ramírez et al., 1996). A l'inverse, la CRH favorise la production de cytokines telle que l'IL-2 qui favorise une réponse Th1 et inhibe la production d'IL-10 favorisant une réponse Th2 (Benou et al., 2005; Oh et al., 2012). Il semble donc que ces deux hormones aient une action opposée sur l'orientation de la réponse immunitaire des $L_T CD4^+$. Toutefois, il faut noter que ces études ont été menées *in vitro* avec des stimulations soit, avec de la CRH soit, avec des glucocorticoïdes. Or, d'un point de vue physiologique, les cellules immunitaires sont exposées constamment aux deux hormones et non uniquement à l'une ou l'autre. Il serait donc important d'étudier l'action conjointe de ces deux hormones sur cette population cellulaire (les L_T) afin de définir leurs rôles dans l'orientation de la réponse immunitaire.

Les cellules dendritiques jouent un rôle essentiel aussi bien dans la présentation antigénique nécessaire à la maturation des lymphocytes (L_T et L_B) que dans l'orientation de la réponse immunitaire des lymphocytes Th. Ces cellules exprimant les récepteurs à la CRH, il serait utile d'étudier l'impact de la CRH sur leurs capacités de présentation antigénique et d'orientation de la réponse immunitaire spécifique. Ces études permettraient d'avoir une meilleure compréhension de l'action de ces deux hormones (CRH et glucocorticoïdes) sur l'activation, la maturation et l'orientation de la réponse immunitaire spécifique lors d'un stress.

La très grande majorité des études porte sur l'action de la CRH par l'intermédiaire des CRH-R1 alors que cette hormone peut également se fixer à son récepteur de type 2 (CRH-R2) même si son affinité est plus faible, comme nous l'avons montré au niveau des L_B . Les CRH-R2 sont présents au niveau du cervelet or, à ce jour, la présence d'aucune UCN (UCN1, 2 ou 3) n'a été mise en évidence au niveau de cette structure. Il se peut que certaines UCN soient présentes en faible quantité au niveau du cervelet et qu'elles n'aient pas pu être mises en évidence jusqu'à maintenant. Une autre possibilité est que certaines UCN soient présentes dans cette structure uniquement à des moments précis. Il est possible également qu'une autre protéine de la famille des UCN pouvant se fixer au CRH-R2 existe, notamment au niveau du cervelet, et ne soit pas encore découverte. Au vu des données actuelles, la seule activation possible du CRH-R2 au niveau du cervelet se ferait donc par le biais de la CRH. Une étude a montré que l'activation du CRH-R2 au

niveau du cervelet inhibe l'activité des cellules de Purkinje (Tao et al., 2009). Ces cellules, qui se projettent au niveau des noyaux profonds du cervelet, utilisent le GABA comme neurotransmetteur. Le GABA étant un neurotransmetteur inhibiteur, les cellules de Purkinje inhibent donc l'activation des noyaux profonds. L'inhibition de l'activité de ces cellules empêche l'action inhibitrice qu'elles exercent sur les noyaux profonds. Ces noyaux peuvent être activés, notamment grâce à des afférences excitatrices glutamatergiques provenant des fibres grimpantes et moussues. Ce processus de régulation permet notamment d'améliorer les capacités motrices. L'activation du CRH-R2 au niveau du cervelet pourrait donc permettre une amélioration des capacités locomotrices et ce phénomène pourrait expliquer les résultats obtenus lors de ce projet.

Il est donc possible que l'action de la CRH via le CRH-R2 soit largement sous-estimée. Dans le cadre de notre étude avec les injections d'antalarmine, il est envisageable que l'inhibition du CRH-R1 conduise la CRH à agir via le CRH-R2 et que l'activation de ce récepteur entraîne l'amélioration des capacités locomotrices que nous observons.

Un autre aspect de ce travail qui serait intéressant d'approfondir concerne le lien potentiel entre la CRH et l'hétérodimère S100A8/A9. En effet, d'après les résultats obtenus lors de l'expérience 3 avec les injections d'antalarmine, l'inhibition du CRH-R1 entraîne une augmentation de l'expression de S100A9 au niveau de l'hypothalamus. A ce jour, aucune étude n'a fait de lien direct entre la CRH et S100A9. Pourtant, une étude récente a montré une augmentation de l'expression de S100A8 et S100A9 au niveau de l'hippocampe de souris lors d'une exposition à un stress social de 8 et 13 jours (stress chronique). Cette augmentation ne s'observe pas lors d'un stress de 2 jours (stress aigu) et ne s'observe plus après 6 jours de récupération chez les souris ayant subi ces 13 jours de stress. Au cours de cette étude, des corrélations ont été faites entre le niveau d'expression de ces marqueurs et les masses de la rate et du thymus. Il s'avère que l'augmentation de l'expression de S100A8/A9 est corrélée à la masse de la rate des souris et inversement corrélée à la masse du thymus (Stankiewicz et al., 2015). Il semble donc qu'une augmentation de ces deux protéines S100A8/A9 puisse avoir une influence sur le SI. De plus, des études ont montré qu'une augmentation de l'expression des S100A8/A9 au niveau du SNC entraîne une perte des contacts cellules-cellules au niveau des

monocouches endothéliales (BHE) permettant ainsi une augmentation de l'infiltration des leucocytes, notamment des neutrophiles (Poh et al., 2012; Vandal et al., 2003). Ces deux marqueurs, S100A8/A9 pourraient donc être impliqués dans les interactions qui existent entre le SNC et le SI, notamment en condition de stress. Pour toutes ces raisons, il semble donc intéressant d'approfondir le rôle de S100A8/A9 dans ces interactions et de comprendre le lien (direct ou indirect) qu'ils peuvent avoir avec la CRH.

Au cours de ce projet, nous avons pu montrer que la CRH est un acteur important de la régulation des fonctions motrices et de la réponse immunitaire. De par son action, cette hormone est un acteur majeur des interactions entre le SNC et le SI. Toutefois, de nombreux points restent encore à éclaircir sur son mode d'action. Il est donc important de mieux connaître et de mieux comprendre l'implication de la CRH dans la réponse au stress afin de pouvoir pallier au mieux les altérations pouvant être engendrées par ce stress. Pour la suite, au vu des résultats obtenus au cours de ce projet de recherche, il serait important de mieux caractériser la présence des récepteurs à la CRH et leur localisation au sein de la rate. Pour cela, nous envisageons des marquages histologiques sur des coupes de rate afin de localiser la présence des récepteurs au sein du tissu. Nous souhaitons aussi définir quelle(s) isoforme(s) du CRH-R2 (CRH-R2 α , CRH-R2 β et/ou sCHR-R2 α) est/sont exprimée(s) au sein des L_B afin de caractériser au mieux leur présence sur ces cellules. Outre cet aspect descriptif, il serait également nécessaire de préciser les mécanismes mis en jeu dans l'induction de la mort cellulaire des L_B. En effet, le marquage seul avec de l'annexine V ne renseigne que sur la mortalité cellulaire sans différencier la nécrose de l'apoptose. Il est donc important de préciser ces mécanismes d'induction de mortalité sur les L_B.

Il importe également d'approfondir l'action synergique de la CRH et des glucocorticoïdes ainsi que le rôle de la CRH dans l'activation du CRH-R2. Ceci pourrait être réalisé dans un premier temps avec des cultures de cellules (du SNC et/ou du SI) stimulées avec de la CRH et/ou de la corticostérone. Ces études *ex vivo* présenteraient aussi l'avantage de pouvoir utiliser des antagonistes tels que l'antalarmine ou l'astressine 2B (antagoniste spécifique du CRH-R2) mais également un antagoniste des GR tel que le RU486 (ou mifépristone). L'ensemble de ces stimulations couplées à l'utilisation de leurs antagonistes respectifs permettrait de

mieux caractériser l'implication de chacune des deux hormones (CRH et corticostérone) et leur action synergique, aussi bien au niveau du SI que du SNC. De plus, l'utilisation d'antagonistes spécifiques du CRH-R1 ou du CRH-R2 permettrait de définir le rôle respectif de chacun des deux récepteurs. Ces études pourraient être suivies d'études *in vivo* sur la souris avec des injections d'astressine 2B afin de comparer les résultats obtenus avec ceux que nous avons obtenus avec les injections d'antalarmine (exp3).

Ces études pourraient être complétées par des immunisations afin d'étudier l'impact de l'inhibition du CRH-R1 et/ou du CRH-R2 sur la mise en place de la réponse immunitaire spécifique. Il serait ainsi possible d'envisager une immunisation avant et/ou après avoir exposé les souris aux antagonistes (antalarmine et astressine 2B) afin d'évaluer l'impact de l'inhibition des récepteurs (CRH-R1 et CRH-R2) sur l'activation et la maturation de la réponse immunitaire spécifique. Ces expériences pourraient également être l'occasion d'étudier l'infiltration des cellules immunitaires au niveau du SNC lors de l'activation du SI (souris immunisées comparées aux souris contrôles) en fonction de l'inhibition des récepteurs à la CRH. En effet, les récepteurs à la CRH (notamment le CRH-R1) jouant un rôle dans la perméabilité de la BHE, il serait intéressant d'évaluer l'impact de leurs inhibitions sur les infiltrations leucocytaires au sein du SNC. De plus, cela permettrait de définir le rôle du CRH-R2 sur ces infiltrations.

En parallèle de ces études, il serait utile de définir un peu plus en détail les liens qu'il pourrait y avoir entre la CRH et la protéine S100A9. En effet, au cours de nos études, nous avons montré que l'inhibition du CRH-R1 semble induire une augmentation de l'expression de S100A9. Toutefois, cette augmentation d'expression est observée uniquement au niveau de l'hypothalamus et avec nos études actuelles, nous ne pouvons pas affirmer que cette augmentation soit une conséquence directe de l'inhibition du CRH-R1. Il serait donc intéressant de savoir si un lien direct existe entre la CRH et ces marqueurs S100. Un brevet a été déposé par l'Université de Laval (Québec) pour un anticorps qui ciblerait et inhiberait les protéines S100, notamment S100A8, S100A9 et S100A12 ([Ryckman et al., 2003](#) ; n° de publication du brevet : WO2004004770 A1). Une collaboration avec le laboratoire de Laval pourrait donc être envisagée afin d'évaluer l'impact de l'inhibition des protéines S100 lors d'une stimulation à la CRH. Ces études pourraient être réalisées

aussi bien sur le SI que sur le SNC avec notamment des cultures organotypiques de coupes de cerveau de souris.

Toutes ces perspectives permettraient sans doute de mieux caractériser l'action de la CRH et de ces différents récepteurs lors d'un stress et d'une réaction inflammatoire.

En résumé, au cours de ce projet, nous avons donc montré que la CRH joue un rôle important au niveau du SNC, du SI et des interactions entre ces deux systèmes. Ce projet débouche sur trois grandes perspectives intéressantes qui permettraient de mieux caractériser l'action de la CRH, à savoir :

- L'action synergique de la CRH et des glucocorticoïdes.
- L'action de la CRH via son récepteur de type 2 (CRH-R2).
- Les interaction(s) entre la CRH et les protéines S100, notamment S100A8 et S100A9 qui sont des marqueurs pro-inflammatoires.

Le développement de ces trois perspectives apporterait des informations élargissant les connaissances actuelles sur la CRH et ses fonctions biologiques et l'impact du stress sur les régulations des SNC et SI. Sur le long terme, on peut espérer que ces connaissances puissent amener à une meilleure prise en charge du stress (que cela soit en préventif ou en curatif) afin de limiter son impact sur la santé.

VIII - Références bibliographiques

A

Agelaki, S., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A.N. (2002). Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice. *Infect. Immun.* *70*, 6068–6074.

Aird, F., Clevenger, C.V., Prystowsky, M.B., and Redei, E. (1993). Corticotropin-releasing factor mRNA in rat thymus and spleen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 7104–7108.

Akiba, Y., Kaunitz, J.D., and Million, M. (2015). Peripheral corticotropin-releasing factor receptor type 2 activation increases colonic blood flow through nitric oxide pathway in rats. *Dig. Dis. Sci.* *60*, 858–867.

Alysandratos, K.-D., Asadi, S., Angelidou, A., Zhang, B., Sismanopoulos, N., Yang, H., Critchfield, A., and Theoharides, T.C. (2012). Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PloS One* *7*, e48934.

Ambrose, M., Ryan, A., O'Sullivan, G.C., Dunne, C., and Barry, O.P. (2006). Induction of apoptosis in renal cell carcinoma by reactive oxygen species: involvement of extracellular signal-regulated kinase 1/2, p38delta/gamma, cyclooxygenase-2 down-regulation, and translocation of apoptosis-inducing factor. *Mol. Pharmacol.* *69*, 1879–1890.

Audhya, T., Jain, R., and Hollander, C.S. (1991). Receptor-mediated immunomodulation by corticotropin-releasing factor. *Cell. Immunol.* *134*, 77–84.

Aumann, T.D., Rawson, J.A., Finkelstein, D.I., and Horne, M.K. (1994). Projections from the lateral and interposed cerebellar nuclei to the thalamus of the rat: a light and electron microscopic study using single and double anterograde labelling. *J. Comp. Neurol.* *349*, 165–181.

Aye, M.M., Kasai, T., Tashiro, Y., Xing, H.Q., Shirahama, H., Mitsuda, M., Suetsugu, T., Tanaka, K., Osame, M., and Izumo, S. (2009). CD8 positive T-cell infiltration in the dentate nucleus of paraneoplastic cerebellar degeneration. *J. Neuroimmunol.* *208*, 136–140.

Ayroldi, E., Cannarile, L., Migliorati, G., Nocentini, G., Delfino, D.V., and Riccardi, C. (2012). Mechanisms of the anti-inflammatory effects of glucocorticoids: genomic and nongenomic interference with MAPK signaling pathways. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *26*, 4805–4820.

B

Bagosi, Z., Jászberényi, M., Szabó, G., and Telegdy, G. (2008). The effects of CRF and the urocortins on [3H]GABA release from the rat amygdala—an in vitro superfusion study. *Brain Res. Bull.* *75*, 15–17.

Bagosi, Z., Balangó, B., Pintér, D., Csabafi, K., Jászberényi, M., Szabó, G., and Telegdy, G. (2015). The effects of CRF and urocortins on the hippocampal glutamate release. *Neurochem. Int.*

Baigent, S.M., and Lowry, P.J. (2000). mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J. Mol. Endocrinol.* *25*, 43–52.

Bains, J.S., Cusulin, J.I.W., and Inoue, W. (2015). Stress-related synaptic plasticity in the hypothalamus. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 377–388.

Bannerman, D.M., Sprengel, R., Sanderson, D.J., McHugh, S.B., Rawlins, J.N.P., Monyer, H., and Seeburg, P.H. (2014). Hippocampal synaptic plasticity, spatial memory and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* *15*, 181–192.

Baschant, U., and Tuckermann, J. (2010). The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *120*, 69–75.

Battaglia, F.P., Benchenane, K., Sirota, A., Pennartz, C.M.A., and Wiener, S.I. (2011). The hippocampus: hub of brain network communication for memory. *Trends Cogn. Sci.* *15*, 310–318.

Bayatti, N., Zschocke, J., and Behl, C. (2003). Brain region-specific neuroprotective action and signaling of corticotropin-releasing hormone in primary neurons. *Endocrinology* *144*, 4051–4060.

Bayatti, N., Hermann, H., Lutz, B., and Behl, C. (2005). Corticotropin-releasing hormone-mediated induction of intracellular signaling pathways and brain-derived neurotrophic factor expression is inhibited by the activation of the endocannabinoid system. *Endocrinology* *146*, 1205–1213.

- Bear, M.F., Connors, B.W., and Paradiso, M.A. (2002). *Neurosciences: à la découverte du cerveau* ([Paris]: Éditions Pradel).
- Bennett, M.C., Mlady, G.W., Fleshner, M., and Rose, G.M. (1996). Synergy between chronic corticosterone and sodium azide treatments in producing a spatial learning deficit and inhibiting cytochrome oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 1330–1334.
- Benou, C., Wang, Y., Imitola, J., VanVlerken, L., Chandras, C., Karalis, K.P., and Khoury, S.J. (2005). Corticotropin-releasing hormone contributes to the peripheral inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 5407–5413.
- Bishop, G.A., and King, J.S. (2013). Modulatory Role of Neuropeptides in the Cerebellum. In *Handbook of the Cerebellum and Cerebellar Disorders*, M. Manto, J.D. Schmahmann, F. Rossi, D.L. Gruol, and N. Koibuchi, eds. (Dordrecht: Springer Netherlands), pp. 971–991.
- Bishop, G.A., Seelandt, C.M., and King, J.S. (2000). Cellular localization of corticotropin releasing factor receptors in the adult mouse cerebellum. *Neuroscience* *101*, 1083–1092.
- Bishop, G.A., Tian, J.B., Stanke, J.J., Fischer, A.J., and King, J.S. (2006). Evidence for the presence of the type 2 corticotropin releasing factor receptor in the rodent cerebellum. *J. Neurosci. Res.* *84*, 1255–1269.
- Blair, R.J.R. (2015). *The Neurobiology of Impulsive Aggression*. *J. Child Adolesc. Psychopharmacol.*
- Blank, T., Nijholt, I., Eckart, K., and Spiess, J. (2002). Priming of long-term potentiation in mouse hippocampus by corticotropin-releasing factor and acute stress: implications for hippocampus-dependent learning. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 3788–3794.
- Bostan, A.C., Dum, R.P., and Strick, P.L. (2013). Cerebellar networks with the cerebral cortex and basal ganglia. *Trends Cogn. Sci.* *17*, 241–254.
- Boucher, W., Kempuraj, D., Michaelian, M., and Theoharides, T.C. (2010). Corticotropin-releasing hormone-receptor 2 is required for acute stress-induced bladder vascular permeability and release of vascular endothelial growth factor. *BJU Int.* *106*, 1394–1399.

Brotto, L.A., Gorzalka, B.B., and Barr, A.M. (2001). Paradoxical effects of chronic corticosterone on forced swim behaviours in aged male and female rats. *Eur. J. Pharmacol.* *424*, 203–209.

Busillo, J.M., and Cidlowski, J.A. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *24*, 109–119.

Busillo, J.M., Azzam, K.M., and Cidlowski, J.A. (2011). Glucocorticoids sensitize the innate immune system through regulation of the NLRP3 inflammasome. *J. Biol. Chem.* *286*, 38703–38713.

C, D

Cardoso, J.C.R., Félix, R.C., Bergqvist, C.A., and Larhammar, D. (2014). New insights into the evolution of vertebrate CRH (corticotropin-releasing hormone) and invertebrate DH44 (diuretic hormone 44) receptors in metazoans. *Gen. Comp. Endocrinol.* *209*, 162–170.

Carraway, R., Cochrane, D.E., Lansman, J.B., Leeman, S.E., Paterson, B.M., and Welch, H.J. (1982). Neurotensin stimulates exocytotic histamine secretion from rat mast cells and elevates plasma histamine levels. *J. Physiol.* *323*, 403–414.

Carter, R.N., Paterson, J.M., Tworowska, U., Stenvers, D.J., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (2009). Hypothalamic-pituitary-adrenal axis abnormalities in response to deletion of 11beta-HSD1 is strain-dependent. *J. Neuroendocrinol.* *21*, 879–887.

Chandras, C., Koutmani, Y., Kokkotou, E., Pothoulakis, C., and Karalis, K.P. (2009). Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B by corticotropin-releasing factor in human monocytes. *Endocrinology* *150*, 4606–4614.

Chen, A., Perrin, M., Brar, B., Li, C., Jamieson, P., Digruccio, M., Lewis, K., and Vale, W. (2005a). Mouse corticotropin-releasing factor receptor type 2alpha gene: isolation, distribution, pharmacological characterization and regulation by stress and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *19*, 441–458.

Chen, A.M., Perrin, M.H., Digruccio, M.R., Vaughan, J.M., Brar, B.K., Arias, C.M., Lewis, K.A., Rivier, J.E., Sawchenko, P.E., and Vale, W.W. (2005b). A soluble mouse brain splice variant of type 2alpha corticotropin-releasing factor (CRF) receptor binds ligands and modulates their activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2620–2625.

- Chen, R., Lewis, K.A., Perrin, M.H., and Vale, W.W. (1993). Expression cloning of a human corticotropin-releasing-factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 8967–8971.
- Chen, Y., Bender, R.A., Frotscher, M., and Baram, T.Z. (2001). Novel and transient populations of corticotropin-releasing hormone-expressing neurons in developing hippocampus suggest unique functional roles: a quantitative spatiotemporal analysis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7171–7181.
- Chen, Y., Bender, R.A., Brunson, K.L., Pomper, J.K., Grigoriadis, D.E., Wurst, W., and Baram, T.Z. (2004a). Modulation of dendritic differentiation by corticotropin-releasing factor in the developing hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 15782–15787.
- Chen, Y., Brunson, K.L., Adelman, G., Bender, R.A., Frotscher, M., and Baram, T.Z. (2004b). Hippocampal corticotropin releasing hormone: pre- and postsynaptic location and release by stress. *Neuroscience* *126*, 533–540.
- Chen, Y., Andres, A.L., Frotscher, M., and Baram, T.Z. (2012a). Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front. Cell. Neurosci.* *6*, 13.
- Chen, Y., Andres, A.L., Frotscher, M., and Baram, T.Z. (2012b). Tuning synaptic transmission in the hippocampus by stress: the CRH system. *Front. Cell. Neurosci.* *6*, 13.
- Chen, Y., Sheng, H., Xu, Y., Zhang, Y., and Ni, X. (2012c). Activation of CRHR2 exerts an inhibitory effect on the expression of collapsin response mediator protein 3 in hippocampal neurons. *Neuropeptides* *46*, 93–98.
- Cochrane, D.E., Emigh, C., Levine, G., Carraway, R.E., and Leeman, S.E. (1982). NEUROTENSIN ALTERS CUTANEOUS VASCULAR PERMEABILITY AND STIMULATES HISTAMINE RELEASE FROM ISOLATED SKIN. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *400*, 396–397.
- Commins, S.P., Borish, L., and Steinke, J.W. (2010). Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* *125*, S53–S72.
- Cordero, M.I., Poirier, G.L., Marquez, C., Veenit, V., Fontana, X., Salehi, B., Ansermet, F., and Sandi, C. (2012). Evidence for biological roots in the transgenerational transmission of intimate partner violence. *Transl. Psychiatry* *2*, e106.

- Cose, S., Brammer, C., Khanna, K.M., Masopust, D., and Lefrançois, L. (2006). Evidence that a significant number of naive T cells enter non-lymphoid organs as part of a normal migratory pathway. *Eur. J. Immunol.* *36*, 1423–1433.
- Cruz-Topete, D., and Cidlowski, J.A. (2015). One hormone, two actions: anti- and pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* *22*, 20–32.
- Cumiskey, D., Pickering, M., and O'Connor, J.J. (2007). Interleukin-18 mediated inhibition of LTP in the rat dentate gyrus is attenuated in the presence of mGluR antagonists. *Neurosci. Lett.* *412*, 206–210.
- Darcet, F., Mendez-David, I., Tritschler, L., Gardier, A.M., Guilloux, J.-P., and David, D.J. (2014). Learning and memory impairments in a neuroendocrine mouse model of anxiety/depression. *Front. Behav. Neurosci.* *8*, 136.
- Davis, null, and Shi, null (2000). The amygdala. *Curr. Biol. CB* *10*, R131.
- Demuyser, T., Deneyer, L., Bentea, E., Albertini, G., Van Liefferinge, J., Merckx, E., De Prins, A., De Bundel, D., Massie, A., and Smolders, I. (2015). In-depth behavioral characterization of the corticosterone mouse model and the critical involvement of housing conditions. *Physiol. Behav.*
- Dermitzaki, E., Tsatsanis, C., Gravanis, A., and Margioris, A.N. (2002). Corticotropin-releasing hormone induces Fas ligand production and apoptosis in PC12 cells via activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* *277*, 12280–12287.
- De Roo, M., Klauser, P., Garcia, P.M., Poglia, L., and Muller, D. (2008). Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog. Brain Res.* *169*, 199–207.
- De Souza, E.B., Perrin, M.H., Insel, T.R., Rivier, J., Vale, W.W., and Kuhar, M.J. (1984). Corticotropin-releasing factor receptors in rat forebrain: autoradiographic identification. *Science* *224*, 1449–1451.
- De Souza, E.B., Perrin, M.H., Whitehouse, P.J., Rivier, J., Vale, W., and Kuhar, M.J. (1985). Corticotropin-releasing factor receptors in human pituitary gland: autoradiographic localization. *Neuroendocrinology* *40*, 419–422.
- Dhabhar, F.S. (2014). Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol. Res.* *58*, 193–210.
- Dhabhar, F.S., and McEwen, B.S. (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain. Behav. Immun.* *11*, 286–306.

- Dietrichs, E. (1984). Cerebellar autonomic function: direct hypothalamocerebellar pathway. *Science* 223, 591–593.
- Ding, Y., Gao, Z.-G., Jacobson, K.A., and Suffredini, A.F. (2010). Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 335, 693–702.
- Droste, S.K., de Groote, L., Atkinson, H.C., Lightman, S.L., Reul, J.M.H.M., and Linthorst, A.C.E. (2008). Corticosterone levels in the brain show a distinct ultradian rhythm but a delayed response to forced swim stress. *Endocrinology* 149, 3244–3253.
- Droste, S.K., Collins, A., Lightman, S.L., Linthorst, A.C.E., and Reul, J.M.H.M. (2009). Distinct, time-dependent effects of voluntary exercise on circadian and ultradian rhythms and stress responses of free corticosterone in the rat hippocampus. *Endocrinology* 150, 4170–4179.
- Duclos, M., Martin, C., Malgat, M., Mazat, J.-P., Chaouloff, F., Mormède, P., and Letellier, T. (2001). Relationships between muscle mitochondrial metabolism and stress-induced corticosterone variations in rats. *Pflüg. Arch.* 443, 218–226.
- Duvarci, S., and Pare, D. (2014). Amygdala microcircuits controlling learned fear. *Neuron* 82, 966–980.

E, F, G

- Eskilsson, A., Mirrasekhian, E., Dufour, S., Schwaninger, M., Engblom, D., and Blomqvist, A. (2014). Immune-induced fever is mediated by IL-6 receptors on brain endothelial cells coupled to STAT3-dependent induction of brain endothelial prostaglandin synthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 15957–15961.
- Esposito, P., Gheorghe, D., Kandere, K., Pang, X., Connolly, R., Jacobson, S., and Theoharides, T.C. (2001). Acute stress increases permeability of the blood-brain-barrier through activation of brain mast cells. *Brain Res.* 888, 117–127.
- Esposito, P., Chandler, N., Kandere, K., Basu, S., Jacobson, S., Connolly, R., Tutor, D., and Theoharides, T.C. (2002). Corticotropin-releasing hormone and brain mast cells regulate blood-brain-barrier permeability induced by acute stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 1061–1066.

- Esposito, P., Basu, S., Letourneau, R., Jacobson, S., and Theoharides, T.C. (2003). Corticotropin-releasing factor (CRF) can directly affect brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* *968*, 192–198.
- Fanselow, M.S., and Dong, H.-W. (2010). Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? *Neuron* *65*, 7–19.
- Foerde, K., and Shohamy, D. (2011). The role of the basal ganglia in learning and memory: Insight from Parkinson's disease. *Neurobiol. Learn. Mem.* *96*, 624–636.
- Fujita, C., Ichikawa, F., Teratani, T., Murakami, G., Okada, T., Shinohara, M., Kawato, S., and Ohta, Y. (2009). Direct effects of corticosterone on ATP production by mitochondria from immortalized hypothalamic GT1-7 neurons. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *117*, 50–55.
- van Gaalen, M.M., Stenzel-Poore, M.P., Holsboer, F., and Steckler, T. (2002). Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behaviour. *Eur. J. Neurosci.* *15*, 2007–2015.
- Gabry, K.E., Chrousos, G.P., Rice, K.C., Mostafa, R.M., Sternberg, E., Negrao, A.B., Webster, E.L., McCann, S.M., and Gold, P.W. (2002). Marked suppression of gastric ulcerogenesis and intestinal responses to stress by a novel class of drugs. *Mol. Psychiatry* *7*, 474–483, 433.
- Ganzel, B.L., Morris, P.A., and Wethington, E. (2010). Allostasis and the human brain: Integrating models of stress from the social and life sciences. *Psychol. Rev.* *117*, 134–174.
- Gao, L., He, P., Sha, J., Liu, C., Dai, L., Hui, N., and Ni, X. (2007). Corticotropin-releasing hormone receptor type 1 and type 2 mediate differential effects on 15-hydroxy prostaglandin dehydrogenase expression in cultured human chorion trophoblasts. *Endocrinology* *148*, 3645–3654.
- Girdler, S.S., and Klatzkin, R. (2007). Neurosteroids in the context of stress: Implications for depressive disorders. *Pharmacol. Ther.* *116*, 125–139.
- Godbout, J.P., and Glaser, R. (2006). Stress-induced immune dysregulation: implications for wound healing, infectious disease and cancer. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *1*, 421–427.
- Goebel, M., Fleming, S.M., Million, M., Stengel, A., Taché, Y., and Wang, L. (2010). Mice overexpressing corticotropin-releasing factor show brain atrophy and motor dysfunctions. *Neurosci. Lett.* *473*, 11–15.

- Gonzales, X.F., Deshmukh, A., Pulse, M., Johnson, K., and Jones, H.P. (2008). Stress-induced differences in primary and secondary resistance against bacterial sepsis corresponds with diverse corticotropin releasing hormone receptor expression by pulmonary CD11c⁺ MHC II⁺ and CD11c⁻ MHC II⁺ APCs. *Brain. Behav. Immun.* 22, 552–564.
- Goodnow, C.C., Vinuesa, C.G., Randall, K.L., Mackay, F., and Brink, R. (2010). Control systems and decision making for antibody production. *Nat. Immunol.* 11, 681–688.
- Gougoura, S., Liakos, P., and Koukoulis, G.N. (2010). Effect of CRH on NO bioavailability, ROS production and antioxidant defense systems in endothelial EAhy926 cells. *Free Radic. Res.* 44, 803–812.
- Gounko, N.V., Swinny, J.D., Kalicharan, D., Jafari, S., Corteen, N., Seifi, M., Bakels, R., and van der Want, J.J.L. (2013). Corticotropin-releasing factor and urocortin regulate spine and synapse formation: structural basis for stress-induced neuronal remodeling and pathology. *Mol. Psychiatry* 18, 86–92.
- Grace, C.R.R., Perrin, M.H., Cattle, J.P., Vale, W.W., Rivier, J.E., and Riek, R. (2007). Common and divergent structural features of a series of corticotropin releasing factor-related peptides. *J. Am. Chem. Soc.* 129, 16102–16114.
- Graybiel, A.M., and Grafton, S.T. (2015). *The Striatum: Where Skills and Habits Meet*. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7.
- Greenwood-Van Meerveld, B., Johnson, A.C., Cochrane, S., Schulkin, J., and Myers, D.A. (2005). Corticotropin-releasing factor 1 receptor-mediated mechanisms inhibit colonic hypersensitivity in rats. *Neurogastroenterol. Motil. Off. J. Eur. Gastrointest. Motil. Soc.* 17, 415–422.
- Gregus, A., Wintink, A.J., Davis, A.C., and Kalynchuk, L.E. (2005). Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. *Behav. Brain Res.* 156, 105–114.
- Gutierrez-Sanmartin, D., Varela-Ledo, E., Aguilera, A., Romero-Yuste, S., Romero-Jung, P., Gomez-Tato, A., and Rigueiro, B.J. (2008). Implication of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms (alpha, beta, gamma and delta) in CD4⁺ T-cell infection with human immunodeficiency virus type I. *J. Gen. Virol.* 89, 1661–1671.

H, I, J

- Harris, H.J., Kotelevtsev, Y., Mullins, J.J., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (2001). Intracellular regeneration of glucocorticoids by 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase (11beta-HSD)-1 plays a key role in regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: analysis of 11beta-HSD-1-deficient mice. *Endocrinology* 142, 114–120.
- Heck, D.H., De Zeeuw, C.I., Jaeger, D., Khodakhah, K., and Person, A.L. (2013). The neuronal code(s) of the cerebellum. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 17603–17609.
- Herman, J.P., Figueiredo, H., Mueller, N.K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M.M., Choi, D.C., and Cullinan, W.E. (2003). Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151–180.
- Herman, J.P., Mueller, N.K., and Figueiredo, H. (2004). Role of GABA and glutamate circuitry in hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress integration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1018, 35–45.
- Hermans, E.J., Henckens, M.J.A.G., Joëls, M., and Fernández, G. (2014). Dynamic adaptation of large-scale brain networks in response to acute stressors. *Trends Neurosci.* 37, 304–314.
- Hirano, T. (2013). Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 89, 183–195.
- Hirano, T., Yamazaki, Y., and Nakamura, Y. (2015). LTD, RP, and Motor Learning. *Cerebellum Lond. Engl.*
- Holmes, M.C., Sangra, M., French, K.L., Whittle, I.R., Paterson, J., Mullins, J.J., and Seckl, J.R. (2006). 11beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 protects the neonatal cerebellum from deleterious effects of glucocorticoids. *Neuroscience* 137, 865–873.
- Horn, T.L., Harder, J.B., Johnson, W.D., Curry, P.T., Parchment, R.E., Morrissey, R.L., Mellick, P.W., Calis, K.A., Gold, P.W., Rice, K.C., et al. (2008). Integration of in vivo and in vitro approaches to characterize the toxicity of Antalarmin, a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist. *Toxicology* 248, 8–17.
- Hsu, D.T., Kirouac, G.J., Zubieta, J.-K., and Bhatnagar, S. (2014). Contributions of the paraventricular thalamic nucleus in the regulation of stress, motivation, and mood. *Front. Behav. Neurosci.* 8.

- Huising, M.O., Pilbrow, A.P., Matsumoto, M., van der Meulen, T., Park, H., Vaughan, J.M., Lee, S., and Vale, W.W. (2011). Glucocorticoids differentially regulate the expression of CRFR1 and CRFR2 α in MIN6 insulinoma cells and rodent islets. *Endocrinology* 152, 138–150.
- Iseme, R.A., McEvoy, M., Kelly, B., Agnew, L., Attia, J., and Walker, F.R. (2014). Autoantibodies and depression: evidence for a causal link? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 40, 62–79.
- Ito, M. (2001). Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles. *Physiol. Rev.* 81, 1143–1195.
- Ito, M. (2009). Functional roles of neuropeptides in cerebellar circuits. *Neuroscience* 162, 666–672.
- Ivy, A.S., Rex, C.S., Chen, Y., Dubé, C., Maras, P.M., Grigoriadis, D.E., Gall, C.M., Lynch, G., and Baram, T.Z. (2010). Hippocampal dysfunction and cognitive impairments provoked by chronic early-life stress involve excessive activation of CRH receptors. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 13005–13015.
- Jedlicka, P., Vlachos, A., Schwarzacher, S.W., and Deller, T. (2008). A role for the spine apparatus in LTP and spatial learning. *Behav. Brain Res.* 192, 12–19.
- Jeljeli, M., Strazielle, C., Caston, J., and Lalonde, R. (2003). Effects of ventrolateral-ventromedial thalamic lesions on motor coordination and spatial orientation in rats. *Neurosci. Res.* 47, 309–316.
- Johnson, S.A., Fournier, N.M., and Kalynchuk, L.E. (2006). Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav. Brain Res.* 168, 280–288.
- Jutkiewicz, E.M., Wood, S.K., Houshyar, H., Hsin, L.-W., Rice, K.C., and Woods, J.H. (2005). The effects of CRF antagonists, antalarmin, CP154,526, LWH234, and R121919, in the forced swim test and on swim-induced increases in adrenocorticotropin in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 180, 215–223.

K, L

- Kalantaridou, S.N., Zoumakis, E., Weil, S., Lavasidis, L.G., Chrousos, G.P., and Makrigiannakis, A. (2007). Reproductive corticotropin releasing hormone, implantation, and fetal immunotolerance. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 44, 461–481.

- Kiapekou, E., Zapanti, E., Voukelatou, D., Mavreli, T., Stefanidis, K., Drakakis, P., Mastorakos, G., and Loutradis, D. (2011). Corticotropin-releasing hormone inhibits in vitro oocyte maturation in mice. *Fertil. Steril.* *95*, 1497–1499.e1.
- Kim, B.-J., Kayembe, K., Simecka, J.W., Pulse, M., and Jones, H.P. (2011). Corticotropin-releasing hormone receptor-1 and 2 activity produces divergent resistance against stress-induced pulmonary *Streptococcus pneumoniae* infection. *J. Neuroimmunol.* *237*, 57–65.
- Kim, H.A., Whittle, S.C., Lee, S., Chu, H.X., Zhang, S.R., Wei, Z., Arumugam, T.V., Vinh, A., Drummond, G.R., and Sobey, C.G. (2014). Brain immune cell composition and functional outcome after cerebral ischemia: comparison of two mouse strains. *Front. Cell. Neurosci.* *8*, 365.
- Kim, S.G., Uğurbil, K., and Strick, P.L. (1994). Activation of a cerebellar output nucleus during cognitive processing. *Science* *265*, 949–951.
- King, B.R., Smith, R., and Nicholson, R.C. (2001). The regulation of human corticotrophin-releasing hormone gene expression in the placenta. *Peptides* *22*, 1941–1947.
- King, B.R., Smith, R., and Nicholson, R.C. (2002). Novel glucocorticoid and cAMP interactions on the CRH gene promoter. *Mol. Cell. Endocrinol.* *194*, 19–28.
- Kinsey, S.G., Bailey, M.T., Sheridan, J.F., Padgett, D.A., and Avitsur, R. (2007). Repeated social defeat causes increased anxiety-like behavior and alters splenocyte function in C57BL/6 and CD-1 mice. *Brain. Behav. Immun.* *21*, 458–466.
- Kiselycznyk, C., and Holmes, A. (2011). All (C57BL/6) Mice are not Created Equal. *Front. Neurosci.* *5*.
- Kishimoto, T., Pearse, R.V., Lin, C.R., and Rosenfeld, M.G. (1995). A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1108–1112.
- Kostich, W.A., Grzanna, R., Lu, N.Z., and Largent, B.L. (2004). Immunohistochemical visualization of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptors in monkey brain. *J. Comp. Neurol.* *478*, 111–125.
- Kott, J.M., Mooney-Leber, S.M., Shoubah, F.A., and Brummelte, S. (2016). Effectiveness of different corticosterone administration methods to elevate corticosterone serum levels, induce depressive-like behavior, and affect neurogenesis levels in female rats. *Neuroscience* *312*, 201–214.

- Kraft, C.A., Efimova, T., and Eckert, R.L. (2007). Activation of PKCdelta and p38delta MAPK during okadaic acid dependent keratinocyte apoptosis. *Arch. Dermatol. Res.* 299, 71–83.
- Kuby, J., Owen, J.A., Punt, J., Stranford, S.A., Jones, P.P., and Sautès-Fridman, C. (2014). *Immunologie [le cours de Janis Kuby]* (Paris: Dunod).
- Kuramoto, E., Fujiyama, F., Nakamura, K.C., Tanaka, Y., Hioki, H., and Kaneko, T. (2011). Complementary distribution of glutamatergic cerebellar and GABAergic basal ganglia afferents to the rat motor thalamic nuclei. *Eur. J. Neurosci.* 33, 95–109.
- Kusnecov, A.W., Liang, R., and Shurin, G. (1999). T-lymphocyte activation increases hypothalamic and amygdaloid expression of CRH mRNA and emotional reactivity to novelty. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 4533–4543.
- Labuz, D., Schreiter, A., Schmidt, Y., Brack, A., and Machelska, H. (2010). T lymphocytes containing β -endorphin ameliorate mechanical hypersensitivity following nerve injury. *Brain. Behav. Immun.* 24, 1045–1053.
- Laffleur, B., Denis-Lagache, N., Péron, S., Sirac, C., Moreau, J., and Cogné, M. (2014). AID-induced remodeling of immunoglobulin genes and B cell fate. *Oncotarget* 5, 1118–1131.
- Lalonde, R., and Strazielle, C. (2007). Brain regions and genes affecting postural control. *Prog. Neurobiol.* 81, 45–60.
- Lewis, K., Li, C., Perrin, M.H., Blount, A., Kunitake, K., Donaldson, C., Vaughan, J., Reyes, T.M., Gulyas, J., Fischer, W., et al. (2001). Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 7570–7575.
- Liao, W., Schones, D.E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T.-Y., Zhao, K., and Leonard, W.J. (2008). Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2–mediated induction of interleukin 4 receptor α -chain expression. *Nat. Immunol.* 9, 1288–1296.
- Lim, H., Jang, S., Lee, Y., Moon, S., Kim, J., and Oh, S. (2012). Enhancement of Anxiety and Modulation of TH and pERK Expressions in Amygdala by Repeated Injections of Corticosterone. *Biomol. Ther.* 20, 418–424.
- Littman, D.R., and Rudensky, A.Y. (2010). Th17 and regulatory T cells in mediating and restraining inflammation. *Cell* 140, 845–858.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., et al. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341.

Lovejoy, D.A., Chang, B.S.W., Lovejoy, N.R., and del Castillo, J. (2014). Molecular evolution of GPCRs: CRH/CRH receptors. *J. Mol. Endocrinol.* 52, T43–T60.

Lu, J.-H., Wang, X.-Q., Huang, Y., Qiu, Y.-H., and Peng, Y.-P. (2015). GABAergic neurons in cerebellar interposed nucleus modulate cellular and humoral immunity via hypothalamic and sympathetic pathways. *J. Neuroimmunol.* 283, 30–38.

M, N

Ma, H., Wang, J., Abdel-Rahman, S.Z., Boor, P.J., and Khan, M.F. (2008). Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 247–253.

Makrigiannakis, A., Zoumakis, E., Kalantaridou, S., Mitsiades, N., Margioris, A., Chrousos, G.P., and Gravanis, A. (2003). Corticotropin-releasing hormone (CRH) and immunotolerance of the fetus. *Biochem. Pharmacol.* 65, 917–921.

Malkoski, S.P., Handanos, C.M., and Dorin, R.I. (1997). Localization of a negative glucocorticoid response element of the human corticotropin releasing hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* 127, 189–199.

Maloney, S.E., Noguchi, K.K., Wozniak, D.F., Fowler, S.C., and Farber, N.B. (2011). Long-term Effects of Multiple Glucocorticoid Exposures in Neonatal Mice. *Behav. Sci. Basel Switz.* 1, 4–30.

Maniam, J., Antoniadis, C., and Morris, M.J. (2014). Early-Life Stress, HPA Axis Adaptation, and Mechanisms Contributing to Later Health Outcomes. *Front. Endocrinol.* 5, 73.

Manto, M., Bower, J.M., Conforto, A.B., Delgado-García, J.M., da Guarda, S.N.F., Gerwig, M., Habas, C., Hagura, N., Ivry, R.B., Mariën, P., et al. (2012). Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum Lond. Engl.* 11, 457–487.

Maras, P.M., and Baram, T.Z. (2012). Sculpting the hippocampus from within: stress, spines, and CRH. *Trends Neurosci.* 35, 315–324.

- Marks, W., Fournier, N.M., and Kalynchuk, L.E. (2009). Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiol. Behav.* *98*, 67–72.
- Márquez, C., Poirier, G.L., Cordero, M.I., Larsen, M.H., Groner, A., Marquis, J., Magistretti, P.J., Trono, D., and Sandi, C. (2013). Peripuberty stress leads to abnormal aggression, altered amygdala and orbitofrontal reactivity and increased prefrontal MAOA gene expression. *Transl. Psychiatry* *3*, e216.
- Martins, J.M., Kastin, A.J., and Banks, W.A. (1996a). Unidirectional specific and modulated brain to blood transport of corticotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* *63*, 338–348.
- Martins, J.M., Kastin, A.J., and Banks, W.A. (1996b). Unidirectional specific and modulated brain to blood transport of corticotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* *63*, 338–348.
- Martins, J.M., Banks, W.A., and Kastin, A.J. (1997a). Acute modulation of active carrier-mediated brain-to-blood transport of corticotropin-releasing hormone. *Am. J. Physiol.* *272*, E312–E319.
- Martins, J.M., Banks, W.A., and Kastin, A.J. (1997b). Transport of CRH from mouse brain directly affects peripheral production of beta-endorphin by the spleen. *Am. J. Physiol.* *273*, E1083–E1089.
- Matsuo, N. (2010). Behavioral profiles of three C57BL/6 substrains. *Front. Behav. Neurosci.*
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., and Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* *58*, 141–149.
- Minas, V., Rolaki, A., Kalantaridou, S.N., Sidiropoulos, J., Mitrou, S., Petsas, G., Jeschke, U., Paraskevaïdis, E.A., Fountzilias, G., Chrousos, G.P., et al. (2007). Intratumoral CRH modulates immuno-escape of ovarian cancer cells through FasL regulation. *Br. J. Cancer* *97*, 637–645.
- Mitra, R., and Sapolsky, R.M. (2008). Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5573–5578.

- Miyata, M., Okada, D., Hashimoto, K., Kano, M., and Ito, M. (1999). Corticotropin-releasing factor plays a permissive role in cerebellar long-term depression. *Neuron* 22, 763–775.
- Mousa, S.A., Bopaiah, C., Stein, C., and Schäfer, M. (2003). Involvement of corticotropin-releasing hormone receptor subtypes 1 and 2 in peripheral opioid-mediated inhibition of inflammatory pain. *Pain* 106, 297–307.
- Muhlert, N., and Lawrence, A.D. (2015). Brain structure correlates of emotion-based rash impulsivity. *NeuroImage* 115, 138–146.
- Murray, S.E., Lallman, H.R., Heard, A.D., Rittenberg, M.B., and Stenzel-Poore, M.P. (2001). A genetic model of stress displays decreased lymphocytes and impaired antibody responses without altered susceptibility to *Streptococcus pneumoniae*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 167, 691–698.
- Murray, S.E., Rosenzweig, H.L., Johnson, M., Huising, M.O., Sawicki, K., and Stenzel-Poore, M.P. (2004). Overproduction of corticotropin-releasing hormone blocks germinal center formation: role of corticosterone and impaired follicular dendritic cell networks. *J. Neuroimmunol.* 156, 31–41.
- Nakahara, H., Konishi, Y., Beach, T.G., Yamada, N., Makino, S., and Tooyama, I. (2010). Infiltration of T lymphocytes and expression of icam-1 in the hippocampus of patients with hippocampal sclerosis. *Acta Histochem. Cytochem.* 43, 157–162.
- Nemeroff, C.B., Widerlöv, E., Bissette, G., Walléus, H., Karlsson, I., Eklund, K., Kilts, C.D., Loosen, P.T., and Vale, W. (1984). Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226, 1342–1344.
- Neuberger, M.S., Ehrenstein, M.R., Rada, C., Sale, J., Batista, F.D., Williams, G., and Milstein, C. (2000). Memory in the B-cell compartment: antibody affinity maturation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 357–360.
- Nicolaidis, N.C., Kyratzi, E., Lamprokostopoulou, A., Chrousos, G.P., and Charmandari, E. (2015). Stress, the Stress System and the Role of Glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 22, 6–19.

O, P

- O’Callaghan, C., Fanning, L.J., and Barry, O.P. (2014). p38 δ MAPK: Emerging Roles of a Neglected Isoform. *Int. J. Cell Biol.* 2014, 272689.

- Ock, J., Lee, H., Kim, S., Lee, W.-H., Choi, D.-K., Park, E.J., Kim, S.-H., Kim, I.K., and Suk, K. (2006). Induction of microglial apoptosis by corticotropin-releasing hormone. *J. Neurochem.* *98*, 962–972.
- Oh, S.H., Park, C.O., Wu, W.H., Kim, J.Y., Jin, S., Byamba, D., Bae, B.G., Noh, S., Lim, B.J., Noh, J.Y., et al. (2012). Corticotropin-releasing hormone downregulates IL-10 production by adaptive forkhead box protein 3-negative regulatory T cells in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.* *129*, 151–159.e1–e6.
- Ohtsuki, G., Piochon, C., and Hansel, C. (2009). Climbing fiber signaling and cerebellar gain control. *Front. Cell. Neurosci.* *3*, 4.
- Orth, D.N., and Mount, C.D. (1987). Specific high-affinity binding protein for human corticotropin-releasing hormone in normal human plasma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *143*, 411–417.
- Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* *29*, 71–109.
- Pelleymounter, M.A., Joppa, M., Ling, N., and Foster, A.C. (2004). Behavioral and neuroendocrine effects of the selective CRF2 receptor agonists urocortin II and urocortin III. *Peptides* *25*, 659–666.
- Perrin, M., Donaldson, C., Chen, R., Blount, A., Berggren, T., Bilezikjian, L., Sawchenko, P., and Vale, W. (1995). Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 2969–2973.
- Petersen, S.E., Fox, P.T., Posner, M.I., Mintun, M., and Raichle, M.E. (1989). Positron emission tomographic studies of the processing of single words. *J. Cogn. Neurosci.* *1*, 153–170.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., and Neuvians, T.P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* *26*, 509–515.
- Pisarchik, A., and Slominski, A.T. (2001). Alternative splicing of CRH-R1 receptors in human and mouse skin: identification of new variants and their differential expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 2754–2756.

- Pitts, M.W., Todorovic, C., Blank, T., and Takahashi, L.K. (2009). The central nucleus of the amygdala and corticotropin-releasing factor: insights into contextual fear memory. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **29**, 7379–7388.
- Poh, K.-W., Yeo, J.-F., Stohler, C.S., and Ong, W.-Y. (2012). Comprehensive gene expression profiling in the prefrontal cortex links immune activation and neutrophil infiltration to antinociception. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **32**, 35–45.
- Potter, E., Behan, D.P., Fischer, W.H., Linton, E.A., Lowry, P.J., and Vale, W.W. (1991). Cloning and characterization of the cDNAs for human and rat corticotropin releasing factor-binding proteins. *Nature* **349**, 423–426.
- Potter, E., Behan, D.P., Linton, E.A., Lowry, P.J., Sawchenko, P.E., and Vale, W.W. (1992). The central distribution of a corticotropin-releasing factor (CRF)-binding protein predicts multiple sites and modes of interaction with CRF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 4192–4196.
- Potter, E., Sutton, S., Donaldson, C., Chen, R., Perrin, M., Lewis, K., Sawchenko, P.E., and Vale, W. (1994). Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8777–8781.
- Przybycien-Szymanska, M.M., Mott, N.N., and Pak, T.R. (2011). Alcohol dysregulates corticotropin-releasing-hormone (CRH) promoter activity by interfering with the negative glucocorticoid response element (nGRE). *PLoS One* **6**, e26647.

Q, R, S

- Qian, L., Qian, C., Chen, Y., Bai, Y., Bao, Y., Lu, L., and Cao, X. (2012). Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19^{hi}FcγR2b^{hi} regulatory B cells through IFN- and CD40L. *Blood* **120**, 581–591.
- Radulovic, M., and Spiess, J. (2001). Immunomodulatory role of the corticotropin-releasing factor. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **49**, 33–38.
- Radulovic, M., Dautzenberg, F.M., Sydow, S., Radulovic, J., and Spiess, J. (1999). Corticotropin-releasing factor receptor 1 in mouse spleen: expression after immune stimulation and identification of receptor-bearing cells. *J. Immunol. Baltim. Md* **162**, 3013–3021.

- Radulovic, M., Weber, C., and Spiess, J. (2000). The effect of acute immobilization stress on the abundance of corticotropin-releasing factor receptor in lymphoid organs. *J. Neuroimmunol.* *103*, 153–164.
- Ramírez, F., Fowell, D.J., Puklavec, M., Simmonds, S., and Mason, D. (1996). Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4⁺ T cells in vitro. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 2406–2412.
- Reul, J.M.H.M., and Holsboer, F. (2002). On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues Clin. Neurosci.* *4*, 31–46.
- Reyes, T.M., Lewis, K., Perrin, M.H., Kunitake, K.S., Vaughan, J., Arias, C.A., Hogenesch, J.B., Gulyas, J., Rivier, J., Vale, W.W., et al. (2001). Urocortin II: a member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2843–2848.
- Rezin, G.T., Cardoso, M.R., Gonçalves, C.L., Scaini, G., Fraga, D.B., Riegel, R.E., Comim, C.M., Quevedo, J., and Streck, E.L. (2008). Inhibition of mitochondrial respiratory chain in brain of rats subjected to an experimental model of depression. *Neurochem. Int.* *53*, 395–400.
- Robson, A.C., Leckie, C.M., Seckl, J.R., and Holmes, M.C. (1998). 11 Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the postnatal and adult rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *61*, 1–10.
- Ross, F.M., Allan, S.M., Rothwell, N.J., and Verkhratsky, A. (2003). A dual role for interleukin-1 in LTP in mouse hippocampal slices. *J. Neuroimmunol.* *144*, 61–67.
- Rybnikova, E.A., Shaliapina, V.G., and Zamuruev, O.N. (1999). [The effect of administering corticoliberin into the striatum on the open-field and shuttle-box behaviors of KHA and KLA strain rats]. *Zhurnal Vyssheĭ Nervn. Deiatelnosti Im. P Pavlova* *49*, 77–83.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., and Tessier, P.A. (2003). Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J. Immunol.* *170*, 3233–3242.
- Sandi, C., Venero, C., and Guaza, C. (1996). Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur. J. Neurosci.* *8*, 794–800.
- Sandman, C.A., and Glynn, L.M. (2009). Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Programs the Fetal and Maternal Brain. *Future Neurol.* *4*, 257–261.

- Saper, C.B., and Lowell, B.B. (2014). The hypothalamus. *Curr. Biol.* **CB 24**, R1111–R1116.
- Sato, Y., Suzuki, H., Sato, T., Suda, T., Yoda, T., Iwakura, Y., and Chida, D. (2010). The role of endogenous glucocorticoids in lymphocyte development in melanocortin receptor 2-deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **403**, 253–257.
- Sawada, K., Fukui, Y., and Hawkes, R. (2008). Spatial distribution of corticotropin-releasing factor immunopositive climbing fibers in the mouse cerebellum: analysis by whole mount immunohistochemistry. *Brain Res.* **1222**, 106–117.
- Schmahmann, J.D., and Pandya, D.N. (1997). Anatomic organization of the basilar pontine projections from prefrontal cortices in rhesus monkey. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17**, 438–458.
- Schutter, D.J.L.G. (2012). The cerebello-hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation hypothesis in depressive disorder. *Med. Hypotheses* **79**, 779–783.
- Seasholtz, A.F., Burrows, H.L., Karolyi, I.J., and Camper, S.A. (2001). Mouse models of altered CRH-binding protein expression. *Peptides* **22**, 743–751.
- Serlin, Y., Shelef, I., Knyazer, B., and Friedman, A. (2015). Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin. Cell Dev. Biol.* **38**, 2–6.
- Shalyapina, V.G., Rakitskaya, V.V., and Rodionov, G.G. (2003). Involvement of dopaminergic processes in the striatum during the effects of corticoliberin on the behavior of active and passive rats. *Neurosci. Behav. Physiol.* **33**, 629–633.
- Silverberg, J., Ginsburg, D., Orman, R., Amassian, V., Durkin, H.G., and Stewart, M. (2010). Lymphocyte infiltration of neocortex and hippocampus after a single brief seizure in mice. *Brain. Behav. Immun.* **24**, 263–272.
- Silverman, M.N., and Sternberg, E.M. (2012). Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction: Glucocorticoid resistance in inflammatory disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1261**, 55–63.
- Silverman, M.N., Pearce, B.D., Biron, C.A., and Miller, A.H. (2005). Immune Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during Viral Infection. *Viral Immunol.* **18**, 41–78.
- Simard, J.-C., Cesaro, A., Chapeton-Montes, J., Tardif, M., Antoine, F., Girard, D., and Tessier, P.A. (2013). S100A8 and S100A9 induce cytokine expression and regulate the NLRP3 inflammasome via ROS-dependent activation of NF- κ B(1.). *PLoS One* **8**, e72138.

- Simon, M.M., Greenaway, S., White, J.K., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., Wells, S., Sorg, T., Wong, K., Bedu, E., Cartwright, E.J., et al. (2013). A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol.* *14*, R82.
- Skórzewska, A., Bidziński, A., Lehner, M., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Wisłowska-Stanek, A., Maciejak, P., Szyndler, J., and Płaźnik, A. (2011). The localization of brain sites of anxiogenic-like effects of urocortin-2. *Neuropeptides* *45*, 83–92.
- Slominski, A. (2007). A nervous breakdown in the skin: stress and the epidermal barrier. *J. Clin. Invest.* *117*, 3166–3169.
- Smith, S.M., and Vale, W.W. (2006). The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* *8*, 383–395.
- Smyth, M.J., Norihisa, Y., Gerard, J.R., Young, H.A., and Ortaldo, J.R. (1991). IL-7 regulation of cytotoxic lymphocytes: pore-forming protein gene expression, interferon-gamma production, and cytotoxicity of human peripheral blood lymphocytes subsets. *Cell. Immunol.* *138*, 390–403.
- Sousa, N., Lukoyanov, N.V., Madeira, M.D., Almeida, O.F., and Paula-Barbosa, M.M. (2000). Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* *97*, 253–266.
- Srinivasan, S., and Avadhani, N.G. (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* *53*, 1252–1263.
- Stankiewicz, A.M., Goscik, J., Majewska, A., Swiergiel, A.H., and Juszcak, G.R. (2015). The Effect of Acute and Chronic Social Stress on the Hippocampal Transcriptome in Mice. *PLoS One* *10*, e0142195.
- Sterner, E.Y., and Kalynchuk, L.E. (2010). Behavioral and neurobiological consequences of prolonged glucocorticoid exposure in rats: Relevance to depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* *34*, 777–790.
- Stolp, J., Turka, L.A., and Wood, K.J. (2014). B cells with immune-regulating function in transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* *10*, 389–397.
- Strazielle, C., Jazi, R., Verdier, Y., Qian, S., and Lalonde, R. (2009). Regional brain metabolism with cytochrome c oxidase histochemistry in a PS1/A246E mouse model of autosomal dominant Alzheimer's disease: Correlations with behavior and oxidative stress. *Neurochem. Int.* *55*, 806–814.

Sturm, M., Becker, A., Schroeder, A., Bilkei-Gorzo, A., and Zimmer, A. (2015). Effect of chronic corticosterone application on depression-like behavior in C57BL/6N and C57BL/6J mice. *Genes Brain Behav.* *14*, 292–300.

Swinny, J.D., Metzger, F., IJkema-Paassen, J., Gounko, N.V., Gramsbergen, A., and van der Want, J.J.L. (2004). Corticotropin-releasing factor and urocortin differentially modulate rat Purkinje cell dendritic outgrowth and differentiation in vitro. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 1749–1758.

T, U, V

Takahashi, K. (2012). Distribution of Urocortins and Corticotropin-Releasing Factor Receptors in the Cardiovascular System. *Int. J. Endocrinol.* *2012*, 1–10.

Tanaka, M., Kádár, K., Tóth, G., and Telegdy, G. (2011). Antidepressant-like effects of urocortin 3 fragments. *Brain Res. Bull.* *84*, 414–418.

Tancredi, V., D'Antuono, M., Cafè, C., Giovedì, S., Buè, M.C., D'Arcangelo, G., Onofri, F., and Benfenati, F. (2000). The inhibitory effects of interleukin-6 on synaptic plasticity in the rat hippocampus are associated with an inhibition of mitogen-activated protein kinase ERK. *J. Neurochem.* *75*, 634–643.

Tao, J., Zhang, Y., Huang, H., and Jiang, X. (2009). Activation of corticotropin-releasing factor 2 receptor inhibits Purkinje neuron P-type calcium currents via G(o)alpha-dependent PKC epsilon pathway. *Cell. Signal.* *21*, 1436–1443.

Tsatsanis, C., Androulidaki, A., Dermitzaki, E., Charalampopoulos, I., Spiess, J., Gravanis, A., and Margioris, A.N. (2005). Urocortin 1 and Urocortin 2 induce macrophage apoptosis via CRFR2. *FEBS Lett.* *579*, 4259–4264.

Tsatsanis, C., Dermitzaki, E., Venihaki, M., Chatzaki, E., Minas, V., Gravanis, A., and Margioris, A.N. (2007). The corticotropin-releasing factor (CRF) family of peptides as local modulators of adrenal function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *64*, 1638–1655.

Vale, W., Spiess, J., Rivier, C., and Rivier, J. (1981). Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* *213*, 1394–1397.

Vandal, K., Rouleau, P., Boivin, A., Ryckman, C., Talbot, M., and Tessier, P.A. (2003). Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 2602–2609.

Vaughan, J., Donaldson, C., Bittencourt, J., Perrin, M.H., Lewis, K., Sutton, S., Chan, R., Turnbull, A.V., Lovejoy, D., and Rivier, C. (1995). Urocortin, a mammalian neuropeptide related to fish urotensin I and to corticotropin-releasing factor. *Nature* 378, 287–292.

Veenit, V., Cordero, M.I., Tzanoulinou, S., and Sandi, C. (2013). Increased corticosterone in peripubertal rats leads to long-lasting alterations in social exploration and aggression. *Front. Behav. Neurosci.* 7, 26.

W

Webster, E.L., Barrientos, R.M., Contoreggi, C., Isaac, M.G., Ligier, S., Gabry, K.E., Chrousos, G.P., McCarthy, E.F., Rice, K.C., Gold, P.W., et al. (2002). Corticotropin releasing hormone (CRH) antagonist attenuates adjuvant induced arthritis: role of CRH in peripheral inflammation. *J. Rheumatol.* 29, 1252–1261.

Weiser, M.J., Osterlund, C., and Spencer, R.L. (2011). Inhibitory effects of corticosterone in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on stress-induced adrenocorticotrophic hormone secretion and gene expression in the PVN and anterior pituitary. *J. Neuroendocrinol.* 23, 1231–1240.

Wille, S., Sydow, S., Palchaudhuri, M.R., Spiess, J., and Dautzenberg, F.M. (1999). Identification of amino acids in the N-terminal domain of corticotropin-releasing factor receptor 1 that are important determinants of high-affinity ligand binding. *J. Neurochem.* 72, 388–395.

Wolf, S.A., Steiner, B., Akpinarli, A., Kammertoens, T., Nassenstein, C., Braun, A., Blankenstein, T., and Kempermann, G. (2009). CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 182, 3979–3984.

Wong-Riley, M.T. (1989). Cytochrome oxidase: an endogenous metabolic marker for neuronal activity. *Trends Neurosci.* 12, 94–101.

Wüppen, K., Oesterle, D., Lewicka, S., Kopitz, J., and Plaschke, K. (2010). A subchronic application period of glucocorticoids leads to rat cognitive dysfunction whereas physostigmine induces a mild neuroprotection. *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996 117, 1055–1065.

Wyrwoll, C.S., Holmes, M.C., and Seckl, J.R. (2011). 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases and the brain: from zero to hero, a decade of progress. *Front. Neuroendocrinol.* 32, 265–286.

Y, Z

Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Haas, K.M., Poe, J.C., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). A Regulatory B Cell Subset with a Unique CD1dhiCD5+ Phenotype Controls T Cell-Dependent Inflammatory Responses. *Immunity* 28, 639–650.

Yau, J.L., Noble, J., Kenyon, C.J., Hibberd, C., Kotelevtsev, Y., Mullins, J.J., and Seckl, J.R. (2001). Lack of tissue glucocorticoid reactivation in 11beta - hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice ameliorates age-related learning impairments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4716–4721.

Yau, J.L.W., McNair, K.M., Noble, J., Brownstein, D., Hibberd, C., Morton, N., Mullins, J.J., Morris, R.G.M., Cobb, S., and Seckl, J.R. (2007). Enhanced hippocampal long-term potentiation and spatial learning in aged 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knock-out mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10487–10496.

Yonelinas, A.P. (2013). The hippocampus supports high-resolution binding in the service of perception, working memory and long-term memory. *Behav. Brain Res.* 254, 34–44.

Yoon, S.H., Kim, B.-H., Ye, S.-K., and Kim, M.-H. (2014). Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* 18, 263–268.

Zafir, A., and Banu, N. (2009). Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46, 53–58.

Zalutskaya, A.A., Arai, M., Bounoutas, G.S., and Abou-Samra, A.B. (2007). Impaired adaptation to repeated restraint and decreased response to cold in urocortin 1 knockout mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 293, E259–E263.

Zattoni, M., Mura, M.L., Deprez, F., Schwendener, R.A., Engelhardt, B., Frei, K., and Fritschy, J.-M. (2011). Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 4037–4050.

- Zhang, C., Kuo, C.-C., Moghadam, S.H., Monte, L., Rice, K.C., and Rissman, R.A. (2015). Corticotropin-Releasing Factor Receptor-1 Antagonism Reduces Oxidative Damage in an Alzheimer's Disease Transgenic Mouse Model. *J. Alzheimers Dis. JAD* 45, 639–650.
- Zhang, Y., Liu, W., Ma, C., Geng, J., Li, Y., Li, S., Yu, F., Zhang, X., and Cong, B. (2012). Endoplasmic reticulum stress contributes to CRH-induced hippocampal neuron apoptosis. *Exp. Cell Res.* 318, 732–740.
- Zhao, Y., Shen, J., Su, H., Li, B., Xing, D., and Du, L. (2008). Chronic corticosterone injections induce a decrease of ATP levels and sustained activation of AMP-activated protein kinase in hippocampal tissues of male mice. *Brain Res.* 1191, 148–156.
- Zhu, J.-N., Yung, W.-H., Kwok-Chong Chow, B., Chan, Y.-S., and Wang, J.-J. (2006). The cerebellar-hypothalamic circuits: potential pathways underlying cerebellar involvement in somatic-visceral integration. *Brain Res. Rev.* 52, 93–106.
- Ziv, Y., Ron, N., Butovsky, O., Landa, G., Sudai, E., Greenberg, N., Cohen, H., Kipnis, J., and Schwartz, M. (2006). Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* 9, 268–275.
- Zmijewski, M.A., and Slominski, A.T. (2009). CRF1 receptor splicing in epidermal keratinocytes: potential biological role and environmental regulations. *J. Cell. Physiol.* 218, 593–602.

Résumé :

Lors d'un stress, l'activation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HHS) conduit à une augmentation de la production de glucocorticoïdes (tel que la corticostérone) par les glandes surrénales. Le rôle de la corticotropin-releasing hormone (CRH), à l'origine de l'activation de l'axe HHS, est encore méconnu. En effet, les récepteurs à la CRH sont présents aussi bien au niveau du système nerveux central (SNC), notamment au niveau du cervelet, qu'au niveau du système immunitaire (SI). Cela suggère donc une action directe possible de cette hormone sur ces deux systèmes. Au cours de ce projet, nous avons étudié les régulations des SNC et SI lors d'un stress, et plus particulièrement le rôle de la CRH et de ses récepteurs dans ces régulations. Suite à des injections chroniques de corticostérone, mimant un stress, nous avons observé une altération des fonctions locomotrices qui semble être reversée lorsque le CRH-R1 est inhibé avec un antagoniste. Ces premiers résultats permettent de mettre en avant un éventuel rôle de la CRH dans la régulation des fonctions motrices au niveau du cervelet en conditions de stress. En parallèle, d'autres études *in vitro* réalisées sur des splénocytes murins stimulés avec de la CRH ont montré une diminution de la viabilité des lymphocytes B (L_B). Suite à ces résultats, nous avons caractérisé pour la première fois la présence de récepteurs à la CRH sur cette population de L_B murins. Ces résultats montrent l'importance de la CRH dans les régulations des SNC et SI en condition de stress et le rôle de cette hormone dans les interactions entre les deux systèmes.

Abstract :

In stress conditions, the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) axis activation leads to an overproduction of glucocorticoids (such as corticosterone in rodent) by adrenal glands and this activation is well characterized. However, various questions remain about the precise role of corticotropin-releasing hormone (CRH), which is at the beginning of the HPA activation. Indeed, CRH receptors are presents both in central nervous system (CNS), especially in cerebellum, and in immune system (IS). This suggest a possible direct action of this hormone on both system. In this project, we studied the regulations on CNS and IS in stress conditions and more particularly the CRH role and these receptors in these regulations. After chronic corticosterone injections, to mimic a stress, we observed a locomotor alteration which seems to be inverted when CRH-R1 were inhibited with an antagonist. These first results show an possible CRH role in locomotor regulation in cerebellum under stress condition. In parallel, others *in vitro* studies performed on murine splenocytes stimulated with CRH showed a B lymphocyte (L_B) viability decrease. Furthermore, we are the first to characterise the CRH receptors on murine L_B . This work show the CRH importance in CNS and IS regulations under stress conditions and its role in interactions between the two systems.

Mots clé : corticotropin-releasing hormone (CRH), stress, cervelet, Lymphocyte B, neuroimmunologie.

Key words : corticotropin-releasing hormone (CRH), stress, cerebellum, B Lymphocyte, neuroimmunology.