Effets du stress expérimental sur les réponses comportementale, gastrique, immunitaire et endocrinienne : implications et interactions des récepteurs opioïdes et benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire chez la souris stressée

Dalila Bousta

▶ **To cite this version:**

Dalila Bousta. Effets du stress expérimental sur les réponses comportementale, gastrique, immunitaire et endocrinienne : implications et interactions des récepteurs opioïdes et benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire chez la souris stressée. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2001. Français. NNT : 2001METZ033S . tel-01775480

HAL Id: tel-01775480
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775480

Submitted on 24 Apr 2018

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

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

AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Université de Metz

ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE, SANTÉ ET ENVIRONNEMENT

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le : 18/12/2001

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Metz

Mention : Pharmacologie

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 2001098S
Cote S/Mz 01/33
Magasin
Loc

Par

Dalila BOUSTA-ER RAJI

Titulaire du Diplôme d'Etudes Approfondies de Toxicologie de l'Environnement

Effets du stress expérimental sur les réponses comportementale, gastrique, immunitaire et endocrinienne : implications et interactions des récepteurs opioïdes et benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire chez la souris stressée

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : **Pr. R. Dantzer**, Professeur à l'université de Bordeaux.
Pr. A. Dalal, Professeur à l'université de Marrakech, Maroc.

Juges : **Pr. C. Younos**, Professeur à l'université de Metz (Directeur de thèse).
Dr. R. Soulimani, MCF à l'Université de Metz (Codirecteur de thèse).
Dr. P. Belon, Directeur de recherche, IFRH-Lyon.
Dr. N. Froment, Chef de service d'Anatomo-Pathologie, CHR Metz-Thionville.

A la mémoire de ma mère
Toujours présente dans mon cœur,
Que ce travail soit l'expression de mon profond amour.

A mon père,
Je te dédie cette thèse, gage de ma profonde affection.

A mon beau frère Saïd et à ma sœur Naîma,
Je ne saurais jamais vous exprimer ma profonde reconnaissance pour le soutien dont vous m'avez fait bénéficier le long de ce travail. Je vous dédie ce travail en témoignage de l'affection et de la tendresse qui nous unient.

A mon époux Abderrahim,
Merci de m'avoir supportée pendant les moments difficiles,
Merci pour ta compréhension et ton soutien,
Je te dédie ce travail en témoignage du grand amour qui nous uni.

A ma fille Rania,
Ma joie de vivre, tu m'as toujours comblée de bonheur.

A mon beau frère Jaâfar et à ma sœur Sâadia
Votre optimisme et votre enthousiasme,
m'ont toujours aidée à aller vers l'avant.
Merci…

A mes frères et à mes belle-soeurs
Mohamed, Faïsl et Cécile, Brahim et Hanane, Rachid
Toujours présents pour m'épauler et me conseiller. Je ne pourrai jamais vous exprimer ma reconnaissance et mon amour.

A mes neveux et nièces,
Nassim, Sanâa, Sarah, Ideer, Lina….
Un grand merci à Nassim, ses connaissances en informatique m'ont beaucoup aidée dans la réalisation de ce mémoire.

REMERCIEMENTS

Le travail exposé dans cette thèse a été réalisé au laboratoire « d'Ethnobotanique et de Pharmacologie », dirigé par le Professeur C. Younos et par le Docteur R. Soulimani.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur C. Younos, directeur du laboratoire d'Ethnobotanique et de Pharmacologie, pour ses qualités humaines et pour la confiance qu'il m'a accordée en m'accueillant dans son laboratoire et en m'offrant l'opportunité de réaliser ce travail. Qu'il soit assuré de mon profond respect.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon directeur de recherche: Monsieur le Docteur R. Soulimani qui m'a accueilli dans son laboratoire et dirigé avec une attention inlassable et une disponibilité remarquable. Je tiens à le remercier pour les judicieux conseils qu'il m'a prodigués tout au long de l'encadrement de ce travail, ainsi que pour la sympathie qu'il m'a témoigné durant toutes ces années que j'ai passées au sein de son équipe. Il s'est toujours montré ouvert à mes idées et m'a laissé, chaque fois qu'il le jugeait possible, une autonomie très instructive et motivante. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Je voudrais exprimer ma grande reconnaissance à Monsieur le Docteur N. Froment, Anatomo-Pathologiste, chef de service d'Anatomo-Pathologique de l'Hôpital Bonsecours de Metz, pour m'avoir aimablement permis l'accès à l'équipement qui nous faisait défaut et pour les judicieux conseils qu'il m'a prodigués pour la réalisation de ce travail. Ses conseils et ses remarques m'ont toujours été très bénéfiques. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

Ma très sincère reconnaissance s'adresse à tout le personnel du laboratoire d'Anatomie-Pathologique, qui par leur sympathie et leur bonne humeur ont rendu ce travail plus facile et très agréable durant toutes ces années que j'ai passées avec eux. C'est avec Monsieur Y. Soulatges, laborantin au laboratoire d'Anatomie Pathologique, que je me suis initiée à la technique de cytométrie de flux. Grâce à lui j'ai beaucoup appris sur cette technique. Je l'en remercie très vivement. Je remercie aussi Monsieur O. Celli pour son aide technique et sa disponibilité à tout moment. Un grand merci à Melle A. Mercier, pour m'avoir permis d'acquérir la technique d'immunohistochimie et pour les sympathiques discussions que j'ai partagées avec elle.

Je remercie chaleureusement Monsieur le Professeur J. Atkinson, Directeur du laboratoire de Pharmacologie Cardio-Vasculaire, à la faculté de Pharmacie à Nancy, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire pour réaliser le dosage des catécholamines. Je remercie vivement aussi le Docteur P. Gummely, Ingénieur de Recherche dans le même laboratoire, pour sa collaboration technique et pour les multiples services qu'il m'a rendus tout au long de la réalisation de la technique d'HPLC. Qu'il trouve ici ma grande reconnaissance.

Je remercie aussi Monsieur le Docteur Sainte Laudy, Directeur des laboratoires Pasteur Cerba et tout le personnel de «l'unité radioactivité» pour le dosage de la corticostérone.

Je suis très honorée que Monsieur le Professeur R. Dantzer participe à ce jury. Je le remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Qu'il veuille croire à mon profond respect et trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Je ne sais comment remercier Monsieur le Professeur A. Dalal, d'avoir accepté avec beaucoup de sympathie d'examiner ce travail et d'être parmi les rapporteurs de cette thèse. Qu'il trouve ici l'expression de ma plus vive gratitude.

Je présente mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur P. Belon, Directeur de recherche Boiron, qui a bien voulu consacrer une partie de son temps en apportant son concours pour juger ce travail. Je suis très honorée de sa présence dans ce jury de thèse. Je remercie vivement les laboratoires Boiron d'avoir financé ce projet de recherche.

Un grand merci à Madame Michel, Docteur en Pharmacie, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire d'Hématologie de Metz et pour son aide précieuse et ses conseils avisés pour la réalisation de la technique du comptage cellulaire.

Je remercie également le Docteur J.Falla pour son encadrement pendant la préparation du DEA.

J'exprime ma grande amitié et affection à Salah, Laila, Anne Maie, Farid...., qui m'ont toujours soutenue dans les moments les plus difficiles de ce travail; devant une tasse de café, on arrive à faire disparaître nos petits soucis de thésards.... Je n'oublierai jamais les moments agréables que j'ai passés avec eux.....

J'adresse mes plus vifs remerciements à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail .

SOMMAIRE

LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....

LISTE DES PRINCIPALES ABRÉVIATIONS.....
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....
INTRODUCTION.....
1. Définition du stress..... 1
2. Physiologie du stress..... 2
OBJECTIFS..... 4
SECTION BIBLIOGRAPHIQUE.....

1. Stress et déficits comportementaux..... 5
2. Stress et lésions gastriques..... 7
2-1. Etudes réalisées chez l'animal..... 9
2-2. Etudes réalisées chez l'Homme..... 10

3. Stress et immunité..... 11
3-1.Rappel du système immunitaire..... 11
3-1-1.Les cellules sanguines..... 11
3-1-1-1. Les polynucléaires..... 11
3-1-1-2. Les mononucléaires..... 13
a. Les monocytes-macrophages..... 13
b. Les lymphocytes..... 14
b-1. Les lymphocytes B..... 15
b-2. Les lymphocytes T..... 18
b-2-1. Peuplement thymique et sous populations thymocytaires..... 18
b-2-2. Stades de différenciation des thymocytes..... 18
b-2-3. Education thymique..... 19
b-2-4. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4)..... 22
b-2-5. Les lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs (CD8)..... 22
b-3. Les cellules tueuses naturelles (NK)..... 24
c. Les organes lymphoïdes primaires ou centraux..... 26
d. Les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques..... 28
3-2. Impact du stress aigu et chronique sur la réponse immunitaire..... 31
3-3. Stress et immunité humorale..... 39
3-4. Interactions des hormones de stress avec la réponse cellulaire Th1 et Th2 et avec les cytokines pro/anti-iinflammatoires..... 40
3-5. Stress, HIV et cancer..... 41

4. Stress/axes corticotrope et sympathique..... 44
4-1. La glande surrénale..... 44
4-1-1. Description générale..... 44
4-1-2. Les corticosurrénales..... 44
4-1-3. La médullosurrénale..... 51
4-2. Les effets à long terme d'un stress prénatal et postnatal sur les paramètres métaboliques .et sur la sécrétion de la corticostérone chez le rat..... 55
4-3. Stress, immunité et hormones dites de stress (corticostérone et catécholamines)..... 55

5. Implication des récepteurs opioïdes dans les altérations immunitaires engendrées par le stress..... 58
5-1. Endomorphines et récepteurs opioïdes..... 58
5-1-1. Structure anatomique de l'hypophyse..... 58
5-1-2. Endomorphines..... 62
5-1-3. Rôle et distribution des récepteurs opioïdergiques 64
5-1-3-1. opiacés et système nerveux central..... 64
5-1-3-2. Propriétés pharmacodynamiques des morphinomimétiques..... 67
5-2. Les effets des peptides opioïdes sur la réponse immunitaire..... 68
5-3. Les effets directs de la morphine sur la réponse lymphocytaire..... 74

6. Implication des récepteurs benzodiazépiniques dans la réponse du système immunitaire induites par le stress..... 76
6-1. Pharmacologie des récepteurs benzodiazépiniques..... 76
6-1-1. Récepteurs benzodiazépiniques centraux..... 76
6-1-1-1. Récepteur Gaba-A..... 76
6-1-1-2. Structure du récepteur 77
6-1-1-3. Propriétés du récepteur..... 78
6-1-2. Les récepteurs benzodiazépiniques périphériques..... 79
6-2. Les sites des benzodiazépines au niveau des cellules immunitaires..... 79
6-2-1. Etudes réalisées chez les rongeurs..... 79
6-2-2. Etudes réalisées chez l'Homme..... 80
6-3. Stress, immunité et benzodiazépines..... 80
6-4. Stress, anxiété, expression des récepteurs benzodiazépiniques..... 82

TRAVAUX PERSONNELS.....
ETUDES FONDAMENTALES.....
PARTIE. I: Validation d'un modèle de stress physique : évaluation de l'intervalle optimal séparant l'immunisation et le stress : effets du stress sur les réponses comportementales, gastriques et immunitaires..... 83
A. But du travail..... 83

B. Matériels et méthodes 83
1. Animaux 83
1-1. L'espèce utilisée 83
1-2. Conditions d'élevage 84
2. Immunisation 84
3. Procédure du stress 85
4. Etudes immunologiques 87
4-1.Comptage des cellules sanguines : Numération formule sanguine (NFS) 87
4-2. Dosage des anticorps totaux : E.L.I.S.A 88
5. Etudes stomacales 89
6. Etudes comportementales 90
6-1. Recherche des effets du stress expérimental sur le comportement général de la souris placée dans les tests de la chambre claire/obscure et de l'ecalier 90
C. Résultats 93
1. Détermination des effets de l'immunisation sur la réponse immunitaire des animaux non stressés 93
2. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress vis à vis de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale 93
3. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress vis à vis de la réponse gastrique 98
4. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress vis à vis de la réponse comportementale 98
4-1. Les effets de l'immunisation sur le comportement général de l'animal dans les tests de la chambre claire /obscure et de l'escalier 98
4-2. Les effets du stress expérimental sur le comportement général de l'animal dans les tests de la chambre claire/obscure et de l'escalier 102
D. Conclusion 104

PARTIE. II: Etudes des effets du stress physique et psychosocial, sur les réponses comportementale, gastrique, endocrinienne et immunitaire 105
A. Définition des objectifs 105
B. Matériels et méthodes 106
1. Recherche des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme et à long terme sur le comportement général de l'animal 106
1-1. Procédure du stress 106
1-1-1. Stress physique 106
1-1-2. Stress psychosocial 106
1-2. Test de la chambre claire/obscure 106
1-3. Test de l'escalier 107

2. Recherche des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme et à long terme sur l'état des surrénales et celui de la muqueuse gastrique chez la souris..... 107
3. Recherche des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme et à long terme sur l'immunité cellulaire de l'animal..... 110
3-1. Comptage des cellules sanguines : Numération formule sanguine..... 110
3-2. Typification cellulaire : Cytométrie de flux (CMF)..... 111
3-2-1. Rappel de la cytométrie de flux 111
3-2-1-1. Historique..... 111
3-2-1-2. Définition de la CMF..... 111
3-2-1-3. Principe de la technique..... 111
3-2-2. Méthodologie..... 118
3-2-2-1. Principe..... 118
3-2-2-2. Préparation..... 118
3-2-2-3. Lecture..... 119
4. Recherche des effets du stress physique et psychosocial sur la réponse endocrinienne chez la souris..... 121
4-1. Dosage de la corticostérone par RIA au tritium après une extraction et chromatographie sur célite..... 121
4-2. Dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).. 121
4-2-1. Présentation de l'appareillage..... 121
4-2-2. Protocole d'extraction de la noradrénaline et de l'adrénaline..... 123
4-2-3. Détermination de la concentration plasmatique de la noradrénaline et de l'adrénaline..... 124
4-2-4. Expression des résultats 124
4-2-4-1. Extraction des standards pour la mesure de la noradrénaline et de l'adrénaline plasmatiques..... 125
4-2-4-2. Mesure de la noradrénaline, l'adrénaline inconnues..... 125
C. Résultats..... 127
1. Les effets du stress physique /psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur le comportement général de l'animal..... 127
1-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur le comportement général de l'animal la souris dans le test de la chambre claire/obscure et l'escalier..... 127
1-1-1. Test de la chambre claire/obscure..... 127
1-1-2. Test de l'escalier..... 134
2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur l'état des surrénales et celui de la muqueuse gastrique chez la souris..... 137
2-1. La muqueuse gastrique..... 137
2-2. Les surrénales..... 137
3. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur l'immunité cellulaire de la souris..... 144
3-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur le nombre des leucocytes..... 144

3-1-1. Effets du stress physique sur la valeur absolue des leucocytes et sur d'autres paramètres sanguins..... 144
3-1-2. Effets du stress psychosocial sur la valeur absolue des leucocytes et sur d'autres paramètres sanguins..... 147
3-2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4), celui des lymphocytes T suppresseurs /cytotoxiques et celui des cellules tueuses naturelles périphériques..... 150
4. Les effets du stress physique/psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur la réponse endocrinienne de la souris..... 156
4-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris..... 156
4-2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme sur la concentration plasmatique de l'adrénaline et la noradrénaline chez la souris..... 157
D. Conclusion..... 161

PARTIE. III: Rôles et implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress..... 163
A.Objectifs..... 163
B. Matériels et méthodes..... 163
- Recherche des effets des opiacés dans les altérations immunitaires induites par le stress..... 163
1. La morphine..... 164
1-1. Propriétés physico-chimiques..... 164
1-2. Pharmacocinétique plasmatique..... 164
1-3. Métabolisme et élimination..... 164
1-4 Utilisation clinique..... 165
2. La naloxone (Narcan R)..... 165
2-1 Propriétés physicochimiques..... 165
2-2. Pharmacocinétique..... 165
2-3. Métabolisme..... 166
2-4. Utilisation clinique..... 166
C.Résultats..... 166
- Détermination de l'implication des récepteurs opioïdes dans les altérations immunitaires induites par le stress..... 167
1. Détermination des effets de la morphine, agoniste des récepteurs opioïdes, sur l'immunité cellulaire chez la souris..... 167
1-1. Effets de la morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires..... 167
1-2. Effets de la morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques..... 168
1-3. Effets de la morphine sur le nombre des cellules NK..... 169
2. Détermination des effets de la naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes, sur l'immunité cellulaire chez la souris..... 171

2-1. Effets de la naloxone sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires..... 171
2-2. Effets de la naloxone sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques 172
2-3. Effets de la naloxone sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez la souris..... 173
3. Détermination de l'implication directe des récepteurs opioïdes dans la réponse immunitaire au stress... 174
3-1. Détermination des effets de la combinaison naloxone/morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires chez les animaux non stressés et stressés..... 174
3-2. Détermination des effets de la combinaison naloxone/morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques chez les animaux non stressés et stressés..... 175
3-3. Détermination des effets de la combinaison naloxone/ morphine sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez les animaux non stressés et stressés..... 176
D. Conclusion..... 178

PARTIE. IV: Rôles et implications des récepteurs benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress..... 179
A.Objectifs 179
B. Matériels et méthodes..... 179
- Recherche des effets des benzodiazépines sur l'immunité cellulaire chez la souris 179
1. Clorazépate dipotassique « Tranxène »..... 180
1-1. Rappel sur les propriétés physiologiques..... 180
1-2. Pharmacocinétique du clorazépate dipotassique 180
2. Flumazénil (Anexate)..... 181
2-1. Propriétés physicochimiques..... 181
2-2. Pharmacocinétique et pharmacodynamie..... 181
C. Résultats..... 183
- Effets des benzodiazépines sur l'immunité cellulaire chez la souris..... 183
1. Détermination des effets du clorazépate dipotassique, agoniste des récepteurs benzodiazépiniques, sur l'immunité cellulaire chez les animaux stressés 183
1-1. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires..... 183
1-2. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques..... 184
1-3. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules tueuses naturelles..... 185
2. Détermination des effets du flumazénil, antagoniste sélectif des récepteurs benzodiazépiniques, sur l'immunité cellulaire chez la souris..... 186
2-1. Effets du flumazénil sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires..... 186
2-2.Effets du flumazénil sur le nombre des T suppresseurs/cytotoxiques 187
2-3. Effets du flumazénil sur le nombre des cellules tueuses naturelles..... 188
3. Détermination de l'implication directe des récepteurs benzodiazépiniques dans la réponse immunitaire au stress..... 189
3-1. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/ clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires chez la souris..... 190

3-2. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/Tranxène sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques chez la souris..... 191
3-3. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/ clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez la souris..... 192
D. Conclusion..... 193
PARTIE. V: Interactions des systèmes opioïdergiques et benzodiazépiniques dans la réponse immunitaire induites par le stress..... 194
A. But du travail..... 194
B. Matériels et méthodes..... 194
C. Résultats..... 195
- Interactions des systèmes opioïdergiques et benzodiazépiniques dans les altérations immunitaires induites par le stress 195
1. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires chez les animaux stressés..... 195
2. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques chez les animaux stressés..... 196
3. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez les animaux stressés..... 197
D. Conclusion..... 198

APPLICATIONS .....
Partie. VI: Détermination des propriétés pharmacologiques de certains produits d'origines animale et végétale vis à vis des perturbations comportementale, gastrique et immunitaire induites par le stress..... 199
A. But du travail 199
B. Matériels et méthodes..... 200
- Recherche des propriétés pharmacologiques de Atropa belladonna. L., du Gelsemium sempervirens. L., du Poumon histamine et de l'Histaminum vis à vis des altérations induites par le stress..... 200
1. Atropa belladonna. L..... 201
1-1. Origine et description..... 201
1-2. Pharmacologie et utilisation clinique..... 201
2. Gelsemium sempervirens. L..... 201
2-1. Origine et description..... 201
2-2. Pharmacologie et utilisation clinique..... 202
3. Poumon histamine..... 202
3-1. Origine et description..... 202
3-2. Pharmacologie 202
3-3. Indications cliniques..... 203
4. Histaminum..... 203

C. Résultats 204
1. Détermination des propriétés pharmacologiques de Atropa belladonna. L., du Gelsemium sempervirens. L. et du Poumon histamine vis à vis des perturbations induites par le stress 204
1-1. Effets pharmacologiques de Atropa belladonna L., du Gelsemium sempervirens L. et du Poumon histamine sur le comportement général des animaux stressés 204
1-1-1. Test de la chambre claire/obscure 204
1-1-1-1. Atropa belladonna L 204
1-1-1-2. Poumon histamine 207
1-1-1-3.Gelsemium sempervirens L. 210
1-1-2. Test de l'escalier 213
1-1-2-1. Atropa belladonna L 213
1-1-2-2. Poumon histamine 215
1-1-2-3. Gelsemium sempervirens L 217
1-2. Effets pharmacologiques de Atropa belladonna L., du Gelsemium sempervirens L. et du Poumon histamine sur la valeur absolue des leucocytes chez les animaux stressés 219
1-2-1.Atropa belladonna L 219
1-2-2. Gelsemium sempervirens L 220
1-2-3. Poumon histamine 220
1-3. Effets pharmacologiques de Atropa belladonna L., du Gelsemium sempervirens L. et du Poumon histamine sur l'état de la muqueuse gastrique des animaux stressés 224
2. Détermination des effets pharmacologiques des doses ultrafaibles de Gelsemium sempervirens L., du Poumon histamine et de l'Histaminum sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez la souris 225
2-1. Gelsemium sempervirens L 225
2-2. Poumon histamine 228
2-3. Histaminum 230

D. Conclusion 234
DISCUSSION 235
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 246
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 249
PUBLICATION .....
ANNEXE TECHNIQUE .....

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications

Bousta D, Soulimani R, Jarmouni S, & Younos C., 2001
Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and *Poumon histamine* in stressed mice.
Journal of Ethnopharmacology, 74, .205-215.

Soulimani R, Younos C, Jarmouni-Idrissi S, **Bousta D**, Khalouki F, Amazzal L, 2001. Behavioral and pharmacol-toxicological study of *Papaver rhoeas* L. In mice. Journal of Ethnopharmacology, 74, 265-274.

Soulimani R, Younos C, Jarmouni S & **Bousta D**, Misslin R, Mortier F, 1997
Behavioral effects of Passiflora incarnata L and its indole alcaloids and flavonoids derivatives and maltol in the mouse. Journal of Ethnopharmacology, 57, 11-20.

Communications

Bousta D, Ammazal L, Soulimani R, Jarmouni I, Belon P, & Younos, C. 2000. Immunoprotective activity of high dilution Gelsemium sempervirens L., Poumon histamine and Histaminium in stressed mice. 1st international colloqium "Health, Environnement and Natural Substances". EBSE-Ethnobotanique and Pharmacology. Metz (Poster).

Bousta D, Soulimani R, Jarmouni S, & Younos C., 1998
Immunoprotective, gastroprotective and neurotropic activity of high dilution of Atropa belladonnaL., Gelsemium sempervirens L., in stressed mice. 1st International Meeting of Aromatic and Medicinal Mediterranean Plants, Conimbiga-Ansiâo-Portugal.

Soulimani R, Jarmouni S, **Bousta D**, & Younos C, 1998
Effects of opiods, cholinergic and dopaminergic agonists on postural and locomotor behaviors of mice in the staicase test. Forum of European Neuroscience, Berlin.

Soulimani R, Younos C, Jarmouni S & **Bousta D**, 1997
Les effets psychopharmacologiques de l'extrait de la passiflore et de ses alcaloïdes indoliques et ses flavonosides chez la souris, 3ème colloque de la société des Neurosciences, Bordeaux.

Bousta D, Soulimani R, Jarmouni S, & Younos C., 1996
Les effets du stress expérimental sur la réponse comportementale, immunitaire et gastrique chez la souris, 1er colloque international des neurosciences, Septembre Strasbourg.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

- **ACTH : Adrénocorticothrophine.**
- **Ac : Anticorps**
- **Ag : Antigène**
- **AMPc: Adénosine Monophosphate Cyclique.**
- **BSA : Albumine du sérum du bœuf.**
- **BZD: Benzodiazépines.**
- **CA : Catécholamines.**
- **CBG: Corticosteroid Binding Globulin.**
- **CD: Classe de différenciation**
- **CFC : Cells Forming Colonies.**
- **CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité**
- **COMT : Cathécol-O-Méthyl Transférase.**
- **Con-A : Concanavaline-A.**
- **CRH : Corticotropin Releasing Hormone**
- **CRF : Corticotropin Releasing Factor.**
- **CTL: Lymphocytes T cytotoxiques.**
- **DAB : Diaminobenzidine.**
- **DHBA : Dihydroxybenzylamine.**
- **DOPA : Dihydroxyphénylalanine.**
- **DTH : Hypersensibilité de contact (Delay Hypersensitivity).**
- **ELISA : Enzym Linked ImmunoSorbent Assay**
- **EM: Eminence Médiane**
- **GM-CFC : Granulocyte-Monocytes, Cells Forming Colonies.**
- **GTPγ: Guanosine 5'o-3-ThiotriPhosphate.**
- **GN: Cellules Gonadotropes.**
- **HES : Hématoxyline Eosine Systémique.**
- **HIV : Human Immunodéfiscience Virus.**
- **HPA: Axe hypothalamo hypophyso-surrénalien (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal).**
- **HSV: Herpes Simplex Virus.**
- **i.c.v : Injection Cérébro-Ventriculaire.**
- **Ig : Immunoglobulines.**

- **IL: Interleukine**
- **i.m.: Intramusculaire.**
- **INF : Interféron .**
- **i.p.: Intrapéritonéale.**
- **KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin**
- **LA: Lobe antérieur**
- **LP : Lobe Postérieur**
- **LPB : Lame Basale Péricordonale**
- **LPS: Lipopolysaccharides**
- **LT : Lobe tubéral**
- **LENK: Leucine Enképhaline.**
- **LEA : Leukocytes Endothelial Adhesion.**
- **MA : Mastocytes.**
- **MENK: Méthionnine Enképhaline.**
- **MAO : Mono-Amine Oxydase.**
- **MSH : Melanocyte Stimulating Hormone**
- **Nt : Neurotensine**
- **NK : Cellules tueuses naturelles (Natural Killer).**
- **OC : Cellules Opio-Corticotropes**
- **P : Cellules à Prolactine.**
- **PB : Polynucléaires basophiles.**
- **PBMC : Les cellules mononucléaires du sang périphérique (Peripheral Blood Mononuclear Cells).**
- **PBR: Les récepteurs benzodiazépiniques périphériques. (Peripheral Benzodiazepine Receptor)**
- **PE : Polynuclèaires Eosinophiles.**
- **PFC : Plage de lyse (Plaque Forming Cells).**
- **PGE_2 : Prostagandines E_2**
- **PHA: Phytohemaglutinin.**
- **PN: Polynucléaires Neutrophiles.**
- **POMC: Pro-Opio-Mélano-Cortine.**
- **S: Les cellules Somatotropes.**
- **SIF: Small Intensley Fluorescent**
- **SNA: Système Nerveux Autonome.**
- **SNC : Système Nerveux Central.**
- **SRBC: Les globules rouges de mouton (Sheep Red Blood Cells)**

- **TGF-β : Facteur de croissance transformant (Transforming Growth Factor-β).**
- **TCR: Récepteurs d'antigènes des cellules T (T Cell Receptor)**
- **T : Cellules thyréotropes.**
- **TH : Tige Hypophysaire**
- **VIP: Peptide Intestinal Vasoactif.**

FIGURES ET TABLEAUX

Tableau 1. Marqueurs de surface des cellules NK murines.

Tableau. 2 Récepteurs des opioïdes et leurs ligands.

Tableau. 3 Les différents paramètres retenus pour la procédure du stress physique.

Tableau. 4 Effet de l'immunisation sur le nombre des leucocytes chez la souris. N=9x2 lots. $p<0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 5 Effet de l'immunisation sur les paramètres sanguins chez la souris. N=9x2 lots. $p< 0.05$ est considérée significatif.

Tableau. 6 Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress sur la réponse leucocytaire chez la souris. N=9x6 lots. $p< 0.05$ est considérée significatif.

Tableau. 7 Effet du stress sur l'immunité humorale (i.e. la concentration des anticorps totaux) chez la souris. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 8 Effet du stress sur la réponse gastrique à différentes intervalles de l'immunisation 1j, 3j et 5j chez la souris. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 9 Effet de l'immunisation sur le comportement général des animaux non stressés dans les tests de l'escalier et de la chambre claire/obscure. N=10x12 lots. $p<0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 10 Effet du stress expérimental appliqué à court terme sur le comportement général de la souris dans le test de la chambre claire/obscure. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 11 Effet du stress expérimental appliqué à court terme sur le nombre des marches montées et des redressements effectués par les animaux dans le test de l'escalier. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 12 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des leucocytes chez la souris. N=9x4 lots. $p<0.05$ est considérée significatif.

Tableau. 13 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur les paramètres sanguins chez la souris. N=9x4 lots. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 14 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des leucocytes chez la souris. N= 9x4 lots. $P<.0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 15 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur les paramètres sanguins chez la souris. N=9x4 lots. $P< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau. 16 Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme (1j), sur la concentration plasmatique de l'adrénaline et de la noradrénaline chez la souris.

Tableau. 17 Effets de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris. N=9x8 lots. CH: Centésimales Hahnemaniennes.
- NS0/S0: °°°:$p< 0.001$, °° : $p<0.01$, ° : $p<0.05$.
- NS0/NS Bel5,9 et 15CH: +++: $p< 0.001$,++: $p< 0.01$.
- S0/S Bel5,9 et 15 CH : *** :$p< 0.001$, **: $p< 0.01$, *: $p< 0.05$.

Tableau. 18 Effets de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris. N=9x8 lots. CH: Centésimales Hahnemaniennes.
- NS0/S0: °°°: p< 0.001, °° : p<0.01, ° : p<0.05.
- NS0/NS Gel 5 et 9 CH:++: p< 0.01, + : p<0.05.
- S0/S Gel 9 et 15 CH : *** :p< 0.001, **:p< 0.01.

Tableau. 19 Effets du *Poumon histamine* sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris. N=9x8 lots. CH : Centésimales Hahnemaniennes.
- NS0/S0: °°°:p< 0.001, °° : p<0.01, ° : p<0.05.
- NS0/NS P. His 9 et15CH: ++: p< 0.01.
- S0/S P. His 5,9 et 15 CH : ***:p< 0.001, **:p< 0.01, *:p< 0.05.

Tableau. 20 Effets de *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. et *Poumon histamine* sur la réponse gastrique chez la souris. N=5x19 lots. CH : Centésimales Hahnemaniennes.
NS : non significatif.
Le taux de protection (%) = a-b/a x 100.
a : moyenne de la longueur des lésions de la muqueuse gastrique chez les animaux traités au NaCl 0.9 %.
b : moyenne de la longueur des lésions de la muqueuse gastrique chez les animaux traités avec les produits étudiés.

Fig. 1 Les voies de communication entre les systèmes nerveux central, endocrinien et immunitaire.

Fig. 2 Coupe longitudinale de la paroi stomacale.

Fig. 3 Aspect morphologique d'un lymphocyte, (a) en microscopie optique, (b) en microscopie électronique.

Fig. 4. Marqueurs de surface des cellules B périphériques murines et humaines.

Fig. 5 Stades de maturation de la lignée B.

Fig. 6 Etapes principales de la différenciation intrathymique du lymphocyte T.

Fig. 7 Marqueurs de surface des cellules T périphériques murines et humaines.

Fig. 8 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes TCD4 ; CPA : cellules d'antigènes.

Fig. 9 Reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte TCD8 ; TCR : récepteur des cellules T.

Fig. 10 Cellule NK (N) fixée à une cellule cible (T).

Fig. 11 Représentation schématique de l'hématopoïèse des cellules B dans la moelle osseuse

Fig. 12 Structure anatomique du thymus

Fig. 13 Structure d'un ganglion lymphatique.

Fig. 14 La rate : a) Tissu lymphoïde de la rate, b) organisation du tissu lymphoïde de la rate.

Fig. 15 Tissu lymphoïde muqueux.

Fig. 16 Structure microscopique de la glande surrénale, (a) schéma. (b) Photographie d'une coupe transversale de la glande surrénale. On aperçoit la cortico-surrénale et une partie de la médullo-surrénale.

Fig. 17 Structure de base des stéroïdes. Elle est composée de trois cycles de cyclohexane et d'un cycle de cyclopentane. Les atomes de carbone sont numérotés pour identifier les groupes fonctionnels.

Fig. 18 Principales chaînes de biogenèse des glucocorticoïdes.

Fig. 19 Les différentes voies de biosynthèse des catécholamines.

Fig. 20 Les différentes parties de l'hypophyse.

Fig. 21 Représentation schématique du lobe antérieur.

Fig. 22 Chaîne peptidique de la pro-opiomélanocortine.

Fig. 23 Représentation de la structure hypothétique et des fonctions du complexe récepteur au GABA-A/récepteur benzodiazépinique/canal chlorique. Les sous unités β contiennent un site de fixation pour le GABA et des sites de fixation pour les barbituriques et certains convulsivants. Les sous unités α contiennent le récepteur benzodiazépinique.

Fig. 24 Schéma représentant les principales étapes de la procédure de la coloration standard à hématoxyline éosine (HE)

Fig. 25 Schéma du principe d'un cytofluorimètre

Fig. 26 Représentation biparamétrique ou cytogramme de cellules de sang périphérique .

Fig. 27 Analyse en double immunofluorescence chez des animaux non stressés. (a): lymphocytes T auxiliaires (T CD4) ; (b) : lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs (TCD8) ; (c) : Cellules naturelles tueuses (NK) ; (d) Témoin négatif de l'aniticorps anti -TCD4; (e) :Témoin négatif de l'anticorps anti-NK.

Fig. 28 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des transitions effectuées par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. NS: non stressés; S: stressés. ***: $p< 0.001$; * : $p< 0.05$.

Fig. 29 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. NS: non stressés; S: stressés. Rd: redressements. *** : $p<0.001$, **: $p< 0.01$; °°°: $p<0.001$.

Fig. 30 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le temps passé par la souris dans les deux compartiments éclairé et obscure du test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Tps: temps. ***: $p<0.001$; °: $p<0.05$.

Fig. 31 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur l'activité locomotrice de la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. **: $p< 0.01$.

Fig. 32 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des transitions effectuées par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N= 10x4 lots. *: $p<0.05$.

Fig. 33 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. NS: non stressés; S: stressés. Rd: redressements. *** : $p<0.001$; **: $p< 0.01$; °: $p<0.05$.

Fig. 34 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le temps passé par la souris dans les deux compartiments éclairé et obscure du test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Tps: temps. ***: $p<0.001$; ** : $p<0.01$; °°: $p< 0.01$; °:$p<0.05$.

Fig. 35 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur l'activité locomotrice de la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. °°°:$p< 0.001$.

Fig. 36 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués dans le test de l'escalier. N=10x4 lots. **:$p<0.01$; *:$p<0.05$.

Fig. 37 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des marches montées dans le test de l'escalier chez la souris. N=10x4 lots. ***: $p<0.01$; **:$p<0.01$.

Fig. 38 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de l'escalier. N=10x4 lots. ***:$p<0.01$; *: $p<0.05$.

Fig. 39 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des marches montées dans le test de l'escalier chez la souris. N=10x4 lots. ***: $p<0.01$; **:$p<0.01$.

Fig. 40 Effet de l'immunisation sur l'immunité cellulaire chez la souris. N=9-10/x4 lots.

NINS:non immunisés non stressés. INS: immunisés non stressés. NIS: non immunisés stressés. IS: immunisés stressés. *: NINS/INS; °: NINS/NIS; +: INS/IS.

Fig. 41 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes auxiliaires TCD4 chez la souris. N= 9-10/x4 lots. NS: non stressés; S: stressés. ***: p<0.001;**:p<0.01.

Fig. 42 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes suppresseurs/cytotoxiques TCD8 chez la souris. N=9-10/x4 lots.

Fig. 43 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des cellules tueuses naturelles NK chez la souris. N=9-10/x4 lots. ***: p< 0.001; *: p< 0.05.

Fig. 44 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes auxiliaires TCD4 chez la souris. N=9-10/x4 lots. ***: p< 0.001; **: p<0.01.

Fig. 45 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes cytotoxiques/suppresseurs TCD8 chez la souris. N=9x4 lots.

Fig. 46 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des cellules tueuses naturelles NK chez la souris. N=9x 4 lots. **: p< 0.01; *: p< 0.05.

Fig. 47 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x4 lots. ***: p< 0.001; *: p< 0.05.

Fig. 48 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x4 lots. *: p<0.05.

Fig. 49 (a) : chromatogramme du mélange NAD standard; (b) : chromatogramme réalisé chez des animaux non stressés. PCA :acide perchlorique, Ad : adrénaline ; Nd : noradrénaline ; D : DHBA.

Fig. 50 Chromatogramme réalisé chez des animaux exposés à court terme au stress physique (a) et d'autres exposés à court terme au stress psychosocial (b). PCA :acide perchlorique, Ad : adrénaline ; Nd : noradrénaline ; D : DHBA.

Fig. 51 structure de la morphine

Fig. 52 Structure de la naloxone

Fig. 53 Effet de la morphine sur le nombre des TCD4 chez les souris stressées. N= 9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. *: NS0/NS1,5et10; +S0,S1,5et10; +: S0/S1,5et10; - : NS5,10/S5,10.

Fig. 54 Effet de la morphine sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.*: NS0/NS1,5et10 ; S0,S1,5et10; +: S0/S1,5 et 10; -:NS10/S10.

Fig. 55 Effet de la morphine sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. *: NS0/NS5,10; S0,S1,5 et10 ; +: S0/S1,5 et 10; -: NS1,5/S1,5.

Fig. 56. Effet de la naloxone sur le nombre des T CD4 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.*: NS0/NS2,10 et 50; S0,2,10 et50; +: S0/S2,10 et 50; -:NS2/S2.

Fig. 57 Effet de la naloxone sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.

Fig. 58 Effet de la naloxone sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS:non stressés; S: stressés. *: NS0/NS2,10 et 50; S0,S2, 10; +: S0/S2,10,50; -:NS2, 10/S2, 10.

Fig. 59 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *: NSN0//NSN2,10/M5 ; °:SN2//SN2/M5; +:SN0//SN2,10/M5;-:SM5//SN2,10/M5.

Fig. 60 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés;
S: stressés.*:NSN0//NSN2,10/M5;°:SM5//SN2,10/M5.

Fig. 61 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. + : S0/SN2/M5; °:SN2//SN2/M5; -: SM5//SN2/M5.

Fig. 62 Structure du clorazépate dipotassique

Fig. 63 Structure du flumazénil

Fig. 64 Effet du Clorazépate dipotassique sur le nombre des T CD4 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS0.1 et1; S0,1 et 10; +: S0/S0.1,1et 10; -: NS0.1/S0.1.

Fig. 65 Effet du Clorazépate dipotassique sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés;S: stressés.*: NS0/NS0.1,10;-: NS0.1/S0.1.

Fig. 66 Effet du Clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.*: NS0/NS 0.1,1; S0, S1 ; +:S0/S0.1,10; -: NS 0.1,1/S0.1,1.

Fig. 67 Effet du flumazénil sur le nombre des TCD4 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS2.5; +: S0/S5,10; -: NS5,10/S5,10; °: NS0/S0,S2.5.

Fig. 68 Effet du flumazénil sur le nombre des TCD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. +:S0/S5;-: NS5,10/S5,10.

Fig. 69 Effet du flumazénil sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS0, NS5,10; +:S0/S5,10; -: NS5,10/S5,10.

Fig. 70 Implications des récepteurs benzodiazépeniques dans la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF2.5,5/T0.1;+:SF0//SF2.5,5/T0.1; °:SF5//SF5/T0.1; -: ST0.1//SF5/T0.1

Fig. 71 Implications des récepteurs benzodiazépeniques dans la réponse des TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF2.5,5/T0.1; +:SF0//SF5/T0.1; -:ST0.1//SF2.5,5/T0.1.

Fig. 72 Implications des récepteurs benzodiazépiniques dans les perturbations de la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés.
*: NSF0//NSF2.5,5/T0.1; +: SF0//SF5/T0.1; °:NSF0//SF2.5; -:NSF2.5, 5/T0.1//SF2.5,5/T0.1.

Fig. 73 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés.
*:NSF0//NSF5/M5; +:SF0//SF10/M5 ; °:SM5//SF5,10/M5; -:SF5//SF5/M5.

Fig. 74 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans les perturbations de la réponse des TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés.

Fig. 75 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés;
S: stressés. +:SF0//SF5,10/M5 ; °:SM5//SF5,10/M5; -:SF10//SF10/M5.

Fig. 76 Schéma des dilutions hahnemaniennes.

Fig. 77 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des transitions effectuées par les souris stressées dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0 ; +:NS0/NSBel15 ; *: S0/SBel5,9 et15 CH.

Fig. 78 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le temps passé dans le compartiment clair par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.
CH : Centésimales Hahnemaniennes. ° :NS0/S0; +:NS0/NSBel5; *:S0/SBel5,9,15 CH.

Fig. 79 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.
CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0; +: NS0/NSBel5,9 et 15 CH; -: NS Bel9 et 15 CH/S Bel9 et 15 CH.

Fig. 80 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des transitions effectuées par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0. *: S0/S Phis 5 et 15 CH.

Fig. 81 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le temps passé dans le compartiment clair par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. CH : Centésimales Hahnemaniennes.
NS: non stressés; S: stressés. °: NS0/S0, *:S0/SP.His5,9,15 CH;
-: NSP.His15CH/SP.His15CH.

Fig. 82 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.
CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0, +: NS0/NSP.his 5,9,15 CH; *: S0/S5 CH.

Fig. 83 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des transitions effectuées par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8lots. NS: non stressés; S: stressés.
CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0; *:S0/SGel5,9,15 CH ;
-: NS Gel5, 9CH/S Gel5 et 9 CH.

Fig. 84 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le temps passé par les souris dans le compartiment clair du test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés.
CH : Centésimales Hanhemaniennes. °: NS0/S0. *: S0/SGel5,9 et 15 CH ;
- : NSGel 5,9 CH/S Gel 5,9CH.

Fig. 85 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. CH :Centésimales Hahnemaniennes. NS: non stressés; S: stressés.°: NS0/S0. +: NS0/ NSGel5 et 9 CH.

Fig. 86 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des marches montées effectuées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés.
CH : Centésimales Hahnemaniennes.°: NS0/S0 ; +: NS0/NSBel5 et 15 CH, *: S0/SBel15 CH ;
- :NSBel15CH/SBel15CH.

Fig. 87 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH :Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0; +: NS0/NSBel9CH; *: S0/SBel15CH.

Fig. 88 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des marches montées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes.
°: NS0/S. +:NS0/NSP.his5,9 et15CH.*: S0/SP.his 5, 9CH ; - : NS P.His5, 9CH/S P.His5, 9 CH.

Fig. 89 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. °:NS0/S0; +: NS0/NS P.his9; *: S0/SP.his 5 et 9 CH.

Fig. 90 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des marches montées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8lots. NS: non stressés. S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. °: NS0/S0; + NS0/NSGel5et 15CH;*: S0/SGel5,15 CH.

Fig. 91 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes.°: NS0/S0; +: NS0/NSGel5et 15 CH.

Fig. 92 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L . sur le nombre des lymphocytes T CD4 chez la souris. N=9x8. NS: non stressés. S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *:NS0/NSGel9,15,30; S0; +:S0/SGel9,15.

Fig. 93 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des lymphocytes T CD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. +: S0/SGel15 et 30; -: NSGel15,30/SGel15,30.

Fig. 94 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés, S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSGel9,S0; +: S0/SGel9,15 et 30; -: NS Gel9,15,30/SGel9,15,30 CH.

Fig. 95 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des lymphocytes T CD4 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSPhis9,15,30 CH, S0 ; + : S0/S P.his,15 et 30 CH.

Fig. 96 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des lymphocytes T CD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSP.his15; +: S0/SP.his15; -: NSP.his15/SP.his15.

Fig. 97 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine*, sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/S0; +:S0/SP.his9,15,30; -: NSP.his15,30/SP.his15,30CH.

Fig. 98 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum,* sur le nombre des lymphocytes TCD4 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSHis9et30CH, S0; +: S0/SHis9 et15; -: NShis30CH/Shis30CH.

Fig. 99 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum*, sur le nombre des lymphocytes TCD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes.

Fig. 100 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum* sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemaniennes. *: NS/NSHis15,30; S0; +: S0/SHis9,15 et 30CH.

INTRODUCTION

1. Définitions du stress

Qu'est ce que le stress ? Depuis de nombreuses années, les chercheurs sont confrontés à cette question. Une ébauche de définition a été établie bien qu'il subsiste encore de multiples inconnues dans une équation qui reste loin d'être résolue.

Depuis le premier article de Selye publié en 1936 sur le syndrome stress, plus de cent vingt mille publications n'ont pas réussi à donner au concept de stress un statut scientifique clairement reconnu et sa définition reste toujours contestée. Les principales critiques de ce concept se résument en deux points :

- Le terme de stress désigne à la fois l'agent agresseur et la réaction de l'organisme à l'agression.
- Les médiateurs impliqués dans l'agression sont nombreux et surtout mal connus sur le plan fonctionnel.

Le processus du stress recouvre un ensemble de processus mis en jeu dans les situations qui exigent de l'individu une réponse d'adaptation. On y met généralement les opérations psychiques de nature émotionnelle, les réponses comportementales d'ajustement et les mécanismes biologiques dont l'axe corticotrope et le système sympathique sont les plus étudiés. Cependant, l'action de ces systèmes endocriniens sur le système cardiovasculaire, le système nerveux central ou le système immunitaire, peut être délétère et peut conduire l'organisme à la maladie, en particulier dans les situations de stimulations répétées et durables.

Le processus du stress est vital pour la stimulation des différentes fonctions biologiques. Un fonctionnement normal de ce processus est indispensable au maintien de la santé physique et psychologique. Le dérèglement de ce dernier entraîne des états pathologiques. Actuellement, le stress est reconnu pour être impliqué dans de nombreuses maladies, dites pluricausales dans lesquelles il peut jouer un rôle que certains qualifient de permissif, d'autres de déclencheurs de la maladie. Les événements de notre vie sont perçus et analysés, le cerveau qui les traduit en terme de danger et de besoin d'adaptation, dès qu'un individu perçoit un danger, réel ou imaginé, son organisme se met en état de défense en recourant à diverses modalités de réponse qui tendront à rétablir l'équilibre ou homéostasie.

2. Physiologie du stress

Les réponses aux facteurs de stress ou environnementaux menaçants, mettent en œuvre des mécanismes d'adaptation centraux et périphériques, qui sont coordonnés par le processus du stress dans le système nerveux central: SNC (cible de la perception du stress), et par ses composantes périphériques: l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (HPA), le système nerveux autonome.
Les principales voies impliquées dans les effets du stress sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale (voir Fig. 1), correspondent à l'activation directe de l'axe corticotrope (CRF, ACTH) avec la libération de glucocorticoïdes, mais également une activation du système sympathique périphérique. En plus de la libération du CRF, de l'adrénaline et de la noradrénaline, certains médiateurs périphériques sécrétés (les enképhalines, les endomorphines, la substance P et le neuropeptide Y) pendant le stress affectent aussi la réponse immunitaire.

A côté de ces réactions aiguës de stress, des agressions moins intenses mais répétées sollicitent à minima ces mêmes systèmes, dont la mise en jeu chronique peut induire un facteur de vulnérabilité et d'épuisement en raison du prolongement de cette sollicitation. Il s'ensuit des difficultés d'adaptation, avec une symptomatologie variée: sueurs, troubles digestifs, symptômes cardio-vasculaires, irritabilité, anxiété et parfois même dépression.
Ces mécanismes nerveux et/ou endocriniens déclenchés par un agent stressant peuvent moduler directement la réponse inflammatoire. Au niveau digestif, le stress peut induire chez l'animal des ulcérations gastriques ou aggraver des lésions inflammatoires induites par des agents chimiques

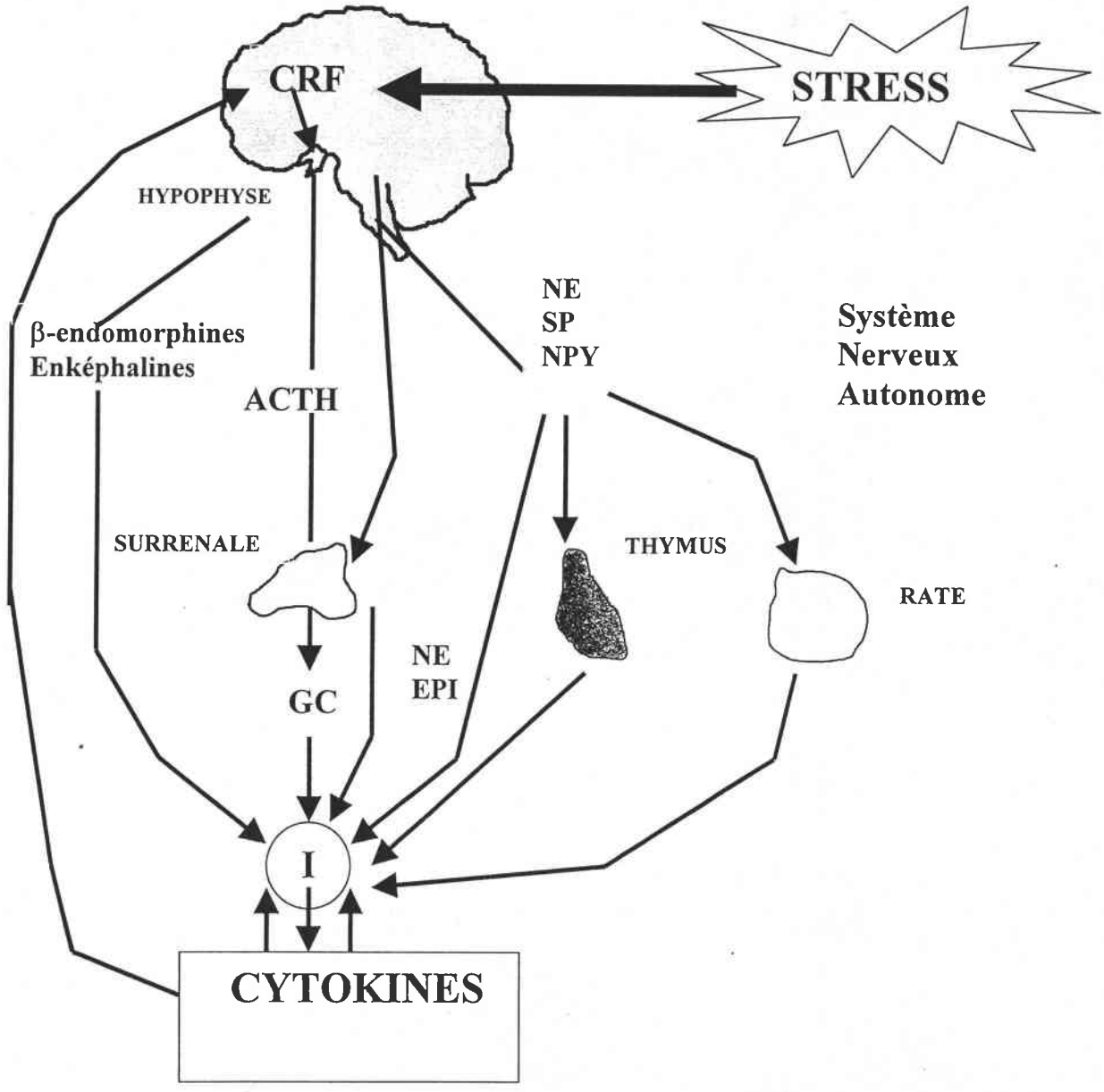


Fig. 1. Les voies de communication entre les systèmes nerveux central, endocrinien et immunitaire : les cytokines sécrétées par les cellules de l'immunité peuvent stimuler en retour l'axe hypophysaire.
GC :glucocorticoïdes ; CRF : corticolibérine ; ACTH : adrénocorticotrophine ; I : immunité ; NE : noradrénaline ; Epi : adrénaline ; NPY : neuropeptide Y ; SP : substance P (inspiré de l'étude de Lawrence & Kim, 2000).

OBJECTIFS

Notre présent travail comporte deux parties, une première partie fondamentale et une deuxième partie appliquée. Nous avons utilisé la souris comme modèle animal :
En première partie, nous avons déterminé :

- d'abord, l'ensemble des paramètres afin de valider des modèles de stress expérimentaux fiables et reproductibles et qui permettent de mettre en évidence, d'une manière aussi rigoureuse que possible, le lien entre le stress et les différentes altérations des systèmes biologiques choisis pour l'étude; le choix des systèmes biologiques était fondé sur la possibilité d'évaluer, d'un point de vue qualitatif et quantitatif, leurs réponses à l'application du stress expérimental; les systèmes immunitaires, comportemental, endocriniens et gastriques ont été retenus, puisqu'ils offrent cette possibilité d'évaluation et constituent des marqueurs physiologiques du stress pathologique.

- puis, nous nous sommes fixés deux objectifs : l'étude du rôle et de l'implication de deux systèmes de neurotransmission, opioïdergiques et benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire engendrées par le stress, l'examen des interactions de ces deux systèmes dans la manifestation de ces perturbations.

Dans une deuxième partie, et après avoir sélectionner les différents paramètres et conditions permettant la mise en évidence d'un effet quantitatif et reproductible du stress sur les réponses comportementales, immunitaires et gastriques. Dans le cadre de notre collaboration avec l'Institut Français de la Recherche en Homéopathie, nous avons tenté d'évaluer les effets protecteurs de certains médicaments homéopathiques : *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L., *Poumon histamine* et *l'Histaminum* vis à vis des perturbations des réponses étudiées induites par le stress expérimental.

Toutefois, nous avons estimé utile de faire précéder la présentation de nos travaux d'un rappel de la littérature sur les différentes composantes du sujet.

SECTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Stress et déficits comportementaux

D'une manière générale, le comportement résulte d'une complexité d'actes et de séquences liées ou non entre elles. Ceci rend impossible la réduction de l'étude du comportement en particulier chez l'animal à quelques paramètres. Les nombreux débats qui ont alimenté la recherche depuis plusieurs décennies, dans ce domaine des neurosciences biologiques et comportementales, et qui ont porté sur la terminologie de certains comportements ainsi que la façon de les quantifier, ne sont pas à leur fin. Afin de limiter ces aléas au niveau de nos études sur le comportement, nous avons choisi deux tests comportementaux, le test de l'escalier et le test de la chambre claire obscure, dans le but de quantifier l'anxiété engendrée par l'application du stress, en relevant les paramètres exploratoires et locomoteurs.

La littérature indique la spécificité pour l'étude de la réaction de l'animal à l'anxiété et au stress (Molinengo & Canaleros, 1970; Simiand *et al.*, 1984; Crawley & Goodwin, 1980). En effet, lorsque l'animal est confronté à des stimulations nouvelles, il peut adopter plusieurs types de réactions, soit une réaction d'approche, soit une réaction d'évitement ou de fuite, en cas de liberté. Si l'espace est réduit l'animal manifeste plutôt un comportement d'agitation. On peut noter aussi des réactions d'attaque ou d'agression. Selon l'intensité anxiogène de cette stimulation nouvelle et l'état préalable de l'animal, ce comportement peut également se traduire par une immobilité (*freezing*). Les différents travaux qui ont été réalisés dans ce domaine ont tous mentionné la diminution de la mobilité de l'animal en réponse à un facteur anxiogène et à une situation de stress (Misslin, 1982 ; Blanchard *et al.*, 1976).

Les travaux de McBlane & Handley, (1994) ont montré que le stress, par immobilisation (60 min), engendre un effet anxiogène (immédiatement et 24 heures après l'application du stress) dans le test du labyrinthe surélevé alors que le stress appliqué pendant 15 min, n'avait aucun effet sur le comportement des rats. Selon cette même étude cette période de 15 min, provoque une augmentation de la concentration plasmatique de la corticostérone qui dure au moins deux heures après le déclenchement du stress.

D'autres études de Weizman *et al.*, (1999) ont montré que le stress (manipulation précoce de l'animal) affecte la réponse comportementale chez le rat. Ce type de stress engendre une augmentation de l'activité exploratoire dans le test de l'open field par rapport à des rats non stressés. Selon cette étude, l'augmentation de l'activité exploratoire chez les individus soumis au stress, est expliquée par une diminution de l'émotivité des animaux.

L'étude de Drago *et al.*, (1999) a montré aussi que le stress prénatal sous forme de nage forcée pendant 15 min dans l'eau froide chez des rates, exerce un effet négatif sur le poids corporel des nouveaux nés. Selon cette étude, le stress engendre un retard au niveau des réflexes du nouveau né, des déficits comportementaux, une augmentation de l'immobilité dans le test de le nage forcée (test du désespoir) ainsi qu'une réduction de la mémorisation dans le test de l'évitement passif. Ces auteurs ont montré aussi que le traitement au diazépam (agoniste des récepteurs benzodiazépiniques), 1h avant l'application du stress, inverse les effets négatifs du stress sur le fœtus, par l'interaction avec les neurotransmetteurs cérébraux pendant la gestation chez le rat.

2. Stress et lésions gastriques

Au niveau de l'estomac, il existe des glandes tubuleuses droites, allongées, à lumière très étroite débouchant au fond par des cryptes de l'épithélium du fundus et du corps de l'estomac, c'est ce qu'on appelle *les glandes fundiques* (voir Fig. 2). Ces tubes glandulaires sont constitués de trois types de cellules:

- Les cellules muqueuses du collet qui sécrètent du mucus.
- Les cellules principales, présentant toutes les caractéristiques morphologiques des cellules sécrétrices de protéines. Le contenu enzymatique de leurs grains de sécrétion est essentiellement représenté par le pepsinogène (enzyme protéolytique).
- Les cellules bordantes, très volumineuses, qui se caractérisent principalement par l'extrême abondance des mitochondries volumineuses et sphériques, par la présence de très nombreuses petites vésicules claires et par l'existence d'un réseau intracellulaire de canalicules ramifiés, formés par des invaginations bordées de microvillosités de la membrane plasmique. Leur rôle est de sécréter l'acide chlorhydrique, sous forme d'ions Cl^+ et H^-, au niveau de la membrane des canalicules intracellulaires.

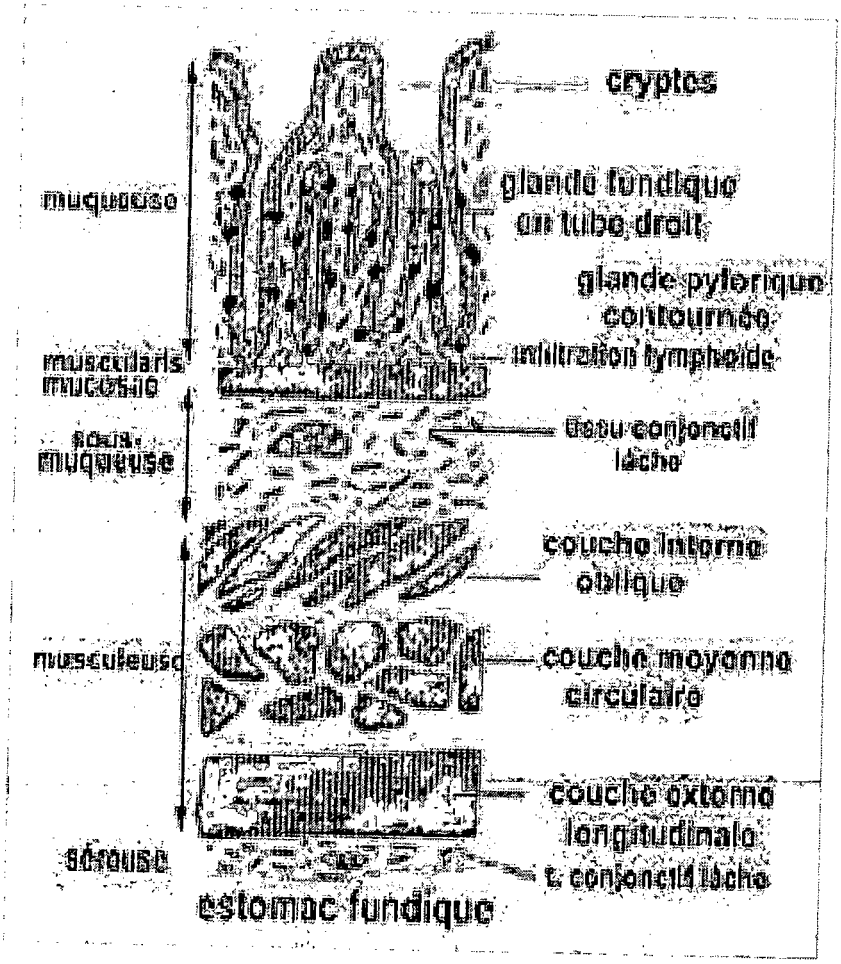


Fig. 2. Coupe longitudinale de la paroi stomacale

(http://cri-cirs-wnts.univ-lyon1.fr)

2-1. Etudes réalisées chez l'animal

Yano & Harada, (1973) ont validé un modèle de stress portant sur les lésions de la muqueuse gastrique et aussi les effets des drogues sur ces lésions. Ces auteurs ont montré que les souris stressées par contention et immergées dans l'eau à 25°C pendant 18 heures, développent le maximum de lésions de la muqueuse gastrique. Cette étude a montré que le sexe n'intervient pas dans l'apparition des lésions chez les animaux stressés. Une autre étude antérieure de Ludwig & Lipkin, (1969), a montré, chez le cobaye, que l'immobilisation engendre des lésions de la muqueuse gastrique, dues à une dégranulation des mastocytes de la muqueuse gastrique, alors que la teneur en acides gastriques n'a pas été modifiée lors du stress. D'autres travaux de Hernandez *et al.*, (1985) ont montré que l'administration intracérébrale (i.c.) de la neurotensine empêche la formation d'ulcères gastriques chez les rats stressés par la contention et l'immersion dans l'eau froide. Cet effet protecteur de la neurotensine est surtout central, car son administration par voie périphérique (i.v.) ne prévient pas les lésions de la muqueuse gastrique. Cette même étude a montré aussi que cet effet cytoprotecteur central de la neurotensine n'interagit pas avec les neurotransmetteurs gabaergique, cholinergique, sérotoninergique et opioïde. Cette interaction de la neurotensine se fait plutôt avec le système dopaminergique.

Une autre étude de Avunduk *et al.*, (1990) a montré chez le rat que le stress de contention combiné au froid (30 min, 2 h et 4 h) est associé à une diminution temps-dépendant de la production des prostaglandines de type E_2 (PGE_2) par la muqueuse gastrique, alors que la production de la prostaglandine I_2 (6 Keto PGF_{1a}) n'a pas été affectée. Ces auteurs ont aussi montré que l'altération de la muqueuse gastrique est maximale chez les animaux stressés durant 2 heures, et que la surrénalectomie renforce les effets ulcérogéniques du stress sur la muqueuse gastrique, mais n'affecte pas la production des prostaglandines. Ishikawa *et al.*, 1999 ont montré que la molécule FR145715 comparée à la ranitidine (antagoniste des récepteurs H_2), s'oppose bien à l'apparition des lésions de la muqueuse gastrique chez le chien exposé à un stress expérimental (contention/immersion dans l'eau). Selon cette même étude, un prétraitement à l'indométacine (inhibiteur des prostaglandines), atténue les effets

bénéfiques de la FR145715 chez les animaux soumis au stress (acidité de l'aspirine). Ceci montre bien que les effets cytoprotecteurs de cette molécule, dépendent de la production endogène des prostaglandines.

2-2. Etudes réalisées chez l'Homme

Les travaux de Raynard & Nitenberg, (1996) et Loperfido *et al.*, (1994) ont montré que «le stress réanimatoire» est à l'origine des lésions gastro-duodénales hémorragiques dites de stress dont le pronostic est plus sévère que les hémorragies ulcéreuses ayant nécessité l'admission à l'hôpital. Ce type de lésions est différent des ulcères peptiques. L'étude de Raynard & Nitenberg, (1996) a défini la lésion gastro-duodénale du stress comme une lésion érosive ou ulcérée de la muqueuse, plus souvent gastrique que duodénale. Ces lésions apparaissent chaque fois qu'il existe un déséquilibre entre les facteurs d'agression et les facteurs de protection de la muqueuse gastrique. Selon les études de Eddleston *et al.*, (1994) et Naveau, (1988), ces lésions sont situées pour 70 % des cas, au niveau de l'estomac et 20 % au niveau du duodénum; ces ulcères sont le plus souvent fundiques et multiples. Chamberlain, 1993, a montré que la stimulation du système végétatif aboutit à un déséquilibre entre les facteurs de protection et d'agression de la muqueuse gastrique. Selon cette même étude, les facteurs responsables de l'altération de l'intégrité de la muqueuse gastrique sont :

- Les troubles de la perméabilité de la muqueuse aux ions H^+ avec une réduction du gradient muqueux en ions H^+, entraînant directement des lésions capillaires et des hémorragies interstitielles.
- Une perturbation du flux sanguin muqueux, aggravant un déséquilibre acide membranaire et entraînant une ischémie pariétale.
- Une modification de la sécrétion de mucus et de bicarbonates, avec la diminution du composant hexosamine du mucus.
- Un défaut de renouvellement cellulaire épithélial.
- Une inhibition de la synthèse des prostaglandines, qui jouent un rôle stabilisateur du système en équilibre, en situation de choc.

3. *Stress et immunité*

3-1. Rappel du système immunitaire

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques, permettant à l'organisme de maintenir la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent, et d'assurer son intégrité en éliminant ses propres constituants altérés ou les agents infectieux, auxquels il est exposé. Cette fonction met en jeu deux catégories de processus d'une part: l'immunité non spécifique ou naturelle: il s'agit des neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, les plaquettes et les cellules de la lignée monocytes/macrophages. D'autre part, l'immunité spécifique ou adaptative qui se développe en quelques jours et se caractérise par la mémoire immunologique (lymphocytes B et T).

3-1-1. Les cellules sanguines

3-1-1-1. Les polynucléaires

Les polynucléaires sont des cellules à noyau polylobé appartenant à la lignée granuleuse, c'est à dire possédant de nombreuses granulations. On peut distinguer trois types de polynucléaires : neutrophiles, basophiles et éosinophiles.

- Les polynucléaires neutrophiles (PN)

Les PN dérivent comme toutes les cellules sanguines d'une même cellule souche au niveau de la moelle osseuse, qui donne naissance à une cellule souche myéloïde puis aux progéniteurs (CFC: cellule formant des colonies) des granulocytes et des monocytes-macrophages (GM-CFC), suivie de la formation du progéniteur direct des polynucléaires(G-CFC). La cellule G-CFC se transforme en myéloblaste puis en

promyélocyte et en myélocyte ; cette phase se caractérise par l'apparition de granulations azurophiles (ou primaires) puis des granulations spécifiques (ou secondaires) qui définissent le type du polynucléaire. Le PN assure des fonctions antibactériennes, anti-virales et anti-parasitaires.

Les PN sanguins se répartissent en deux secteurs à peu près équivalents: un secteur circulant, accessible à la numération sanguine (1800 à 7000/µl), et un secteur marginé, adhérant à l'endothélium au niveau des veinules post-capillaires.

- Les polynucléaires basophiles (PB) et mastocytes (MA)

**** Les polynucléaires basophiles***

Comme pour les PN, les PB sont formés à partir de précurseurs médullaires, donnant naissance successivement aux myéloblastes, aux promyélocytes, et enfin aux myélocytes, cellules qui vont générer les métamyélocytes et les polynucléaires.

Les PB représentent 0.3 % des cellules tissulaires et seulement 0.1 % des cellules du sang. Ils constituent la source principale d'histamine. Les PB jouent un rôle important dans la réaction d'hypersensibilité à médiation cellulaire (type IV).

**** Les mastocytes***

Les mastocytes sont nombreux dans le tissu conjonctif, principalement autour des vaisseaux sanguins des nerfs et sous les membranes épithéliales ou séreuses. Chez l'homme, ils sont abondants dans les plaques de PEYER, dans la peau, les muqueuses (utérines, urinaires, digestives) et les sous muqueuses (respiratoires).

Le rôle majeur des MA est représenté par son action dans les réactions d'hypersensibilité de type 1, et par conséquent dans l'apparition et le maintien de la réaction inflammatoire (libération d'histamine). Ils ont une activité antiparasitaire contre un certain nombre de parasites. Enfin les MA présentent aussi une activité anti-tumorale.

- Les polynucléaires éosinophiles (PE)

Les PE représentent un faible pourcentage (0.1 %) du sang total. Les PE sont produits par la moelle osseuse. C'est une cellule à noyau bilobé. Elle contient de très nombreuses granulations spécifiques acidophiles, et de nombreux médiateurs aux propriétés cytotoxiques. Ils sont également capables de phagocyter des particules opsonisées, ce qui leur confère une activité anti-parasitaire importante. Ils jouent aussi un rôle important dans l'hypersensibilité de type I.

3-1-1-2 Les mononucléaires

a. <u>les monocytes-macrophages</u>

Dans la moelle osseuse, les précurseurs myéloïdes donnent naissance aux monoblastes, qui évoluent en promonocytes. Un macrophage est un type cellulaire mononuclé doué de la propriété de présenter des antigènes et sous certaines conditions, capable de phagocyter. Après adhérence aux cellules endothéliales, les monocytes quittent le flux sanguin pour joindre les tissus, ou`ils se différencient en macrophages. Le macrophage est un acteur central dans la réponse immunitaire. Le macrophage est aussi capable de présenter sur des molécules de classe I ou II du complexe majeur d'histocompatibilité, des peptides antigéniques, qui sont reconnus par le récepteur T des lymphocytes. Enfin, le macrophage est capable de synthétiser et de libérer de nombreux médiateurs, en particulier les cytokines, qui interviendront dans l'activation cellulaire et aussi dans les réponses inflammatoires.

b. <u>Les lymphocytes</u>

Les précurseurs des cellules lymphoïdes (cellules souches lymphoïdes) sont produits dans le foie fœtal au cours de la gestation, puis la moelle osseuse hématopoïétique. Ils se différencient ultérieurement, au sein des organes lymphoïdes centraux en deux populations distinctes fonctionnellement : les lymphocytes T produits par le thymus, à partir de précurseur T.

Les lymphocytes B à partir des pré-B (précurseur des lymphocytes B), par la moelle osseuse chez l'homme ou la bourse de Fabricius chez les oiseaux. Une autre population des lymphocytes, les cellules NK (Natural Killer), se distingue par sa fonction cytotoxique (Fig. 3).

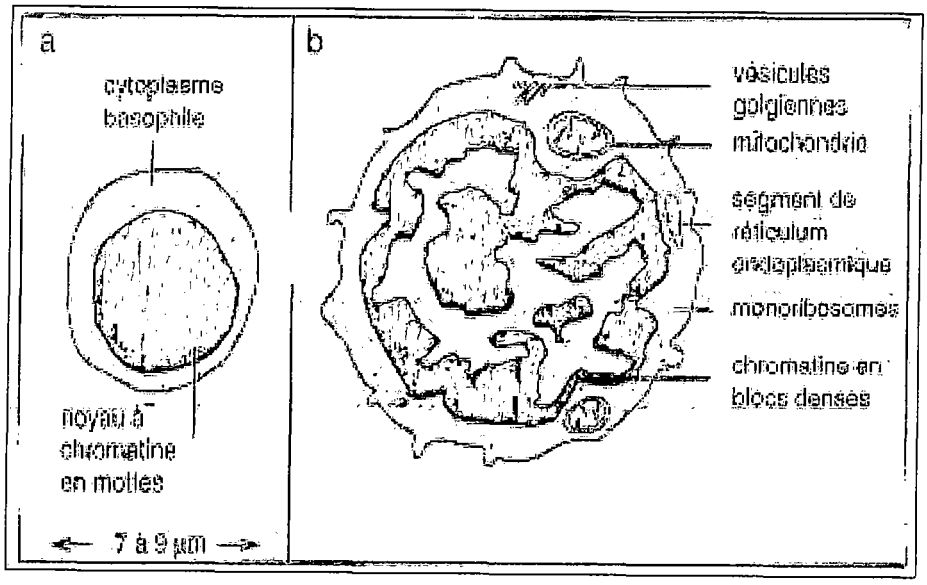


Fig. 3 Aspect morphologique d'un lymphocyte,
(a) en microscopie optique, (b) en microscopie électronique
(d'après Genetet, Immunologie, 1997)

b-1. Les lymphocytes B

b-1-1. Stades de maturation des lymphocytes B (Fig. 4 et Fig. 5)

La maturation des lymphocytes B est prise en charge par la moelle osseuse hématopoïétique chez l'homme. Les différentes étapes de maturation des lymphocytes B à partir des cellules souches lymphoïdes peuvent être suivies par l'apparition séquentielle de « marqueurs » qui leur sont propres et qui permettent de les caractériser.

- Cellules pré-B

Les lymphocytes B expriment à un stade précoce les molécules de classe II du CMH, mais, le premier marqueur signant leur engagement dans la lignée B est l'apparition de chaînes lourdes μ d'immunoglobulines, présentes dans le cytoplasme de ces cellules.

- Cellules B immatures

La maturation s'accompagne d'une diminution de la taille des cellules et de l'apparition de chaînes légères d'immunoglobulines. Les cellules qui se divisent acquièrent la capacité de produire des immunoglobulines: Ig_M intracytoplasmiques puis exprimés souvent en association avec des Ig_D à la membrane des lymphocytes B.

- Cellules B matures

La maturation des cellules B est achevée en périphérie. Elle se traduit par une augmentation de la densité d'Ig_M de surface, la capacité des cellules à produire d'autres types d'Ig (Ig_G, Ig_E et Ig_A). Ils présentent aussi des marqueurs spécifiques de sous populations, récepteurs de surface pour signaux d'activation.

b-1-2. Marqueurs de différenciation des lymphocytes B

Cette maturation s'accompagne de l'apparition de molécules de surface identifiées à l'aide d'anticorps monoclonaux. Des molécules d'apparition précoce et transitoire, caractérisent le stade des cellules pré-B : CD_9 et CD_{10}. Les molécules CD_{19}, et CD_{20} caractérisent tous les B (pan B). D'autres apparaissent plus tardivement définissant les sous populations B comme CD_{22} ou CD_{21}. Lorsque les cellules B arrivent au stade d'activation, d'autres molécules apparaissent : CD_{23}, CD_{39}, CD_{40}.
Chez la souris, les antigènes de différenciation ont été décrits sur les cellules B (Lyb-1 à Lyb-5). Les alloantigènes Lyb-3 et Lyb-5 sont présents sur les cellules B matures.

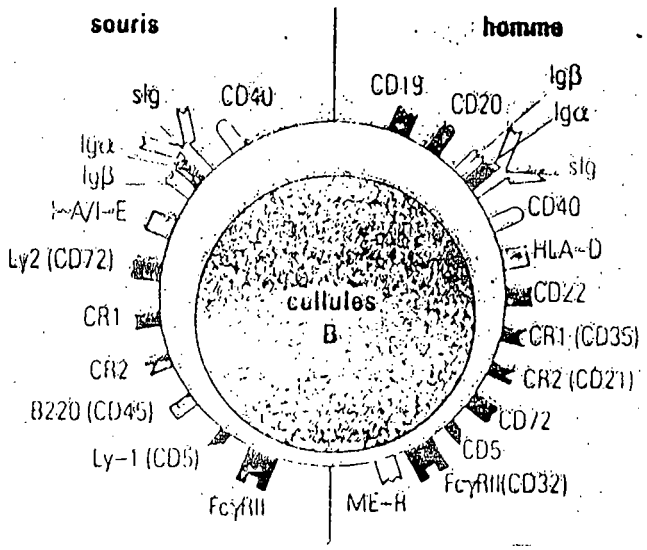


Fig. 4. Marqueurs de surface des cellules B périphériques murines et humaines
(d'après Roitt, Immunologie ; 1997)

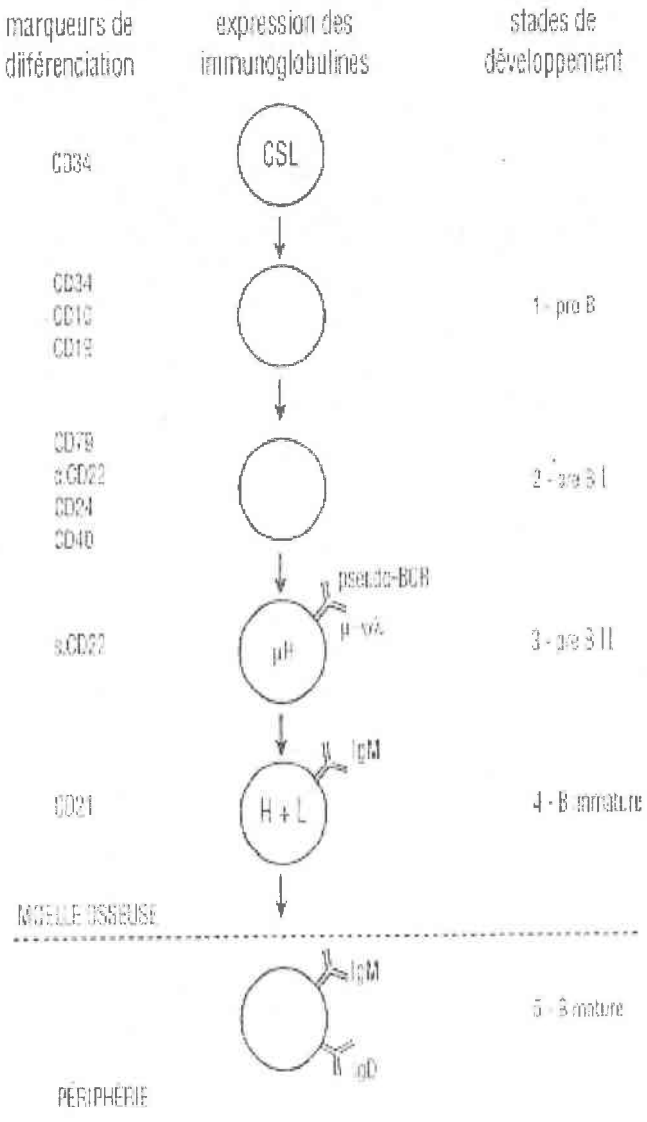


Fig. 5 Stades de maturation de la lignée B

(d'après Genetet, Immunologie, 1997)

b-2. Les lymphocytes T

b-2-1. Peuplement thymique et sous populations thymocytaires

Le thymus est peuplé de plusieurs populations de thymocytes correspondant aux différents stades de maturation des lymphocytes T: la majorité des cellules du cortex (80-85%), et les thymocytes médullaires ont la morphologie des lymphocytes T, 10 à 15% des cellules corticales ont les caractéristiques des cellules immatures.
La zone médullaire contient 10 à 15% des cellules, qui sont des thymocytes matures, identiques aux lymphocytes T périphériques. Le cortex thymique à forte densité cellulaire surtout des thymocytes communs (70%) et des cellules immatures telles que les cellules blastiques en voie de division (10%) et cellules précurseurs (5 %).

b-2-2. Stades de différenciation des thymocytes (Fig. 6, Fig. 7)

L'acquisition des marqueurs de différenciation permet de définir les différents stades de maturation intra-thymique. Les marqueurs pan T (CD2 et CD7), exprimés très tôt au cours de la différenciation, sont présents sur la majorité des thymocytes et des lymphocytes T. La molécule CD3 apparaît plus tardivement, marqueur des lymphocytes T matures, elle est exprimée sur 30 à 40% des thymocytes, dont les cellules médullaires, expriment également la molécule CD6 (20 à 25 %). Les molécules CD4 et CD8 sont exprimées simultanément par les thymocytes communs (co-expression CD4/CD8), puis par des sous-populations médullaires distinctes de thymocytes matures et de lymphocytes T fonctionnels CD4 ou CD8.

b-2-3. Education thymique

Parmi les cellules produites par le thymus, 10 % seulement sont exportées vers la périphérie, 90 % meurent *in situ*. Le principal mécanisme conduisant à la destruction des thymocytes serait une sélection des cellules utiles parmi les cellules produites.

Cette sélection s'exercerait en deux temps:

- Une sélection positive

Cette première étape se déroulerait dans le cortex thymique. Seules les cellules possédant un récepteur T (TCR) ayant une affinité particulière pour les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (le CMH), du Soi reçoivent un signal leur permettant de poursuivre leur maturation. Les cellules ayant une affinité trop forte, ou n'ayant pas d'affinité pour les molécules du CMH seraient éliminées. Les thymocytes concernés possèdent les deux types de molécules impliquées, dans la liaison au CMH: CD4 pour les molécules du CMH de classe II; CD8 pour les molécules de classe I.

- Une sélection négative

Les thymocytes possédant un récepteur adapté à la reconnaissance des antigènes non rencontrés pendant la vie fœtale (les antigènes étrangers à l'organisme), mais aussi les autoantigènes d'apparition plus tardive au cours de développement, poursuivront leur maturation. Alors que, les thymocytes qui reconnaissent des antigènes rencontrés lors de la vie fœtale vont recevoir un signal qui conduira au stade d'immaturité, et à leur élimination : soit une destruction cellulaire par un phénomène d'apoptose; on parle alors d'une délétion clonale; soit une élimination fonctionnelle par inactivation, responsable d'un état de tolérance (les cellules seront incapables de réagir à ce même antigène).
Les précurseurs des lymphocytes T ayant subi la double sélection, positive puis négative, se différencient alors en lymphocytes T matures exprimant soit la molécule CD4, soit la molécule CD8 capables de reconnaître les antigènes étrangers et de

répondre spécifiquement à cet antigène lorsqu'il sera présenté en association avec les molécules du CMH, respectivement de classe II ou de classe I.

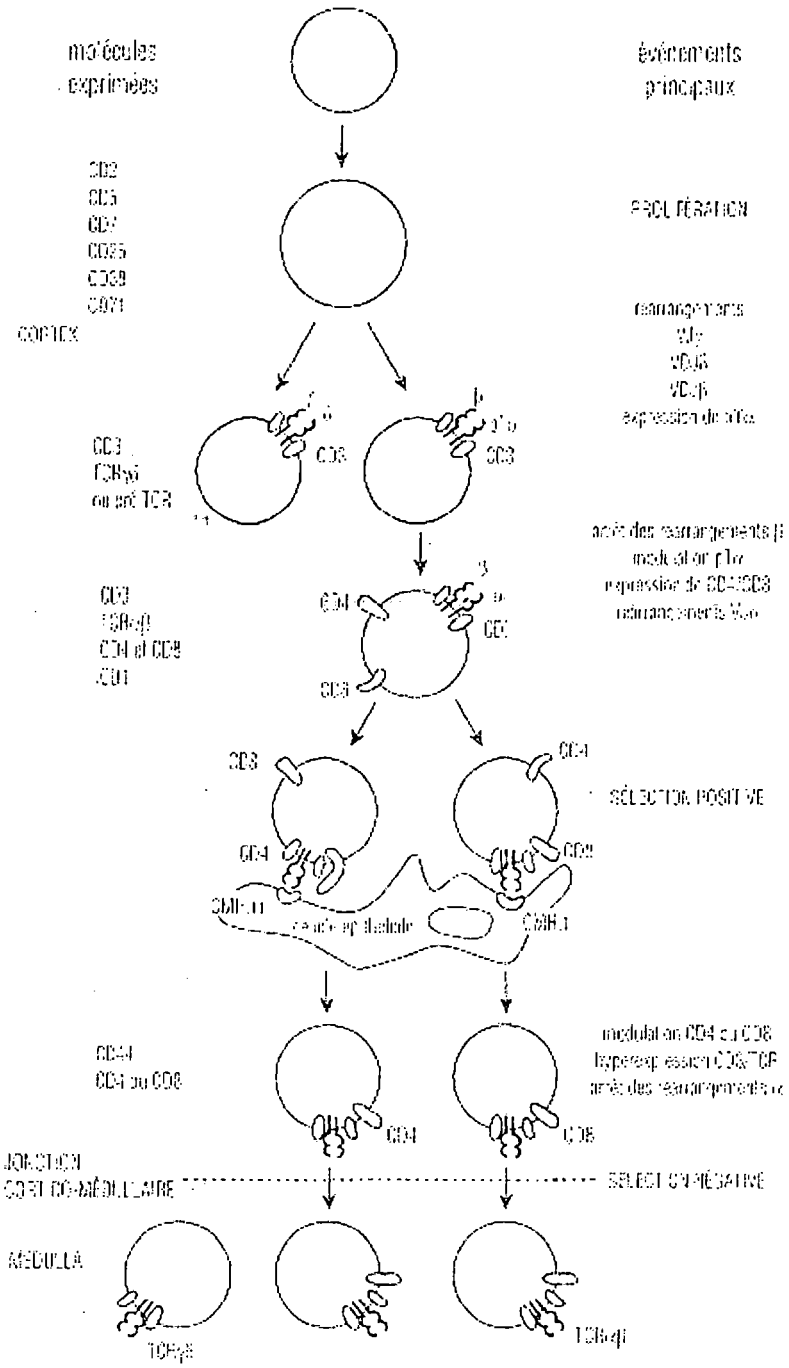


Fig. 6 Etapes principales de la différenciation intrathymique du lymphocyte T (d'après Genetet, Immunologie, 1997)

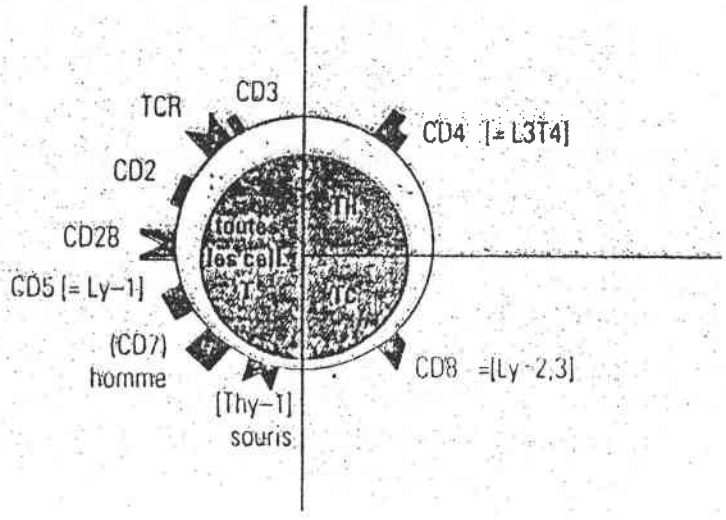


Fig. 7 Marqueurs de surface des cellules T périphériques murines et humaines

(d'après Roitt, Immunologie ; 1997)

b-2-4. Les lymphocytes T auxiliaires (CD4) (Fig. 8)

Une grande partie de ces molécules (CD4) est produite par les T activés. Elles ont des rôles complémentaires mais aussi antagonistes. Certaines favorisent une réponse de type cellulaire, d'autres la production d'anticorps. On distingue deux types de sous populations de T auxiliaires appelées Th1 et Th2.

Les Th1 sont donc essentiellement caractérisés par leur production d'IL-2, IFNγ et TNFβ et favorisent l'activité des cellules T cytotoxiques, des cellules NK et l'activation des macrophages. Ces éléments sont surtout impliqués dans la réponse immunitaire de type cellulaire. Les Th2 permettent la sécrétion d'anticorps ainsi que le recrutement des éosinophiles et mastocytes. Ils participent donc à la réponse humorale de type immédiat. En plus, ces deux populations s'antagonisent l'une l'autre; l'INFγ (produit par les Th1 et les cellules NK) inhibant les Th2, l'IL10 (produit par les Th2) bloquant la production des cytokines des Th1. La molécule CD4 est exprimée sur tous les thymocytes corticaux, sur une fraction importante de thymocytes médullaires et 60 % des cellules T périphériques (Les lymphocytes T du sang) dont elle définit une population majeure, en majorité de type auxiliaire ou inducteur, reconnaissant les antigènes d'histocompatibilité de classe II.

b-2-5. Les lymphocytes T cytotoxiques /suppresseurs (CD8) (Fig. 9)

Les lymphocytes CTL (Cytotoxic T Lymphocytes) appartiennent à la population des lymphocytes T caractérisés par l'expression de la molécule CD8, par le biais de leur récepteur d'antigène des lymphocytes T (TCR). Ces cellules sont capables de reconnaître les antigènes sous forme de peptides associés à des molécules de classe I du CMH. Ceci leur confère la propriété de détruire pratiquement toute cellule infectée par un virus, un parasite ou une bactérie. Les lymphocytes T CD8 à propriétés suppressives sont capables de synthétiser des facteurs suppresseurs de la production d'anticorps ou de l'activation des cellules cytotoxiques (NK et CTL).

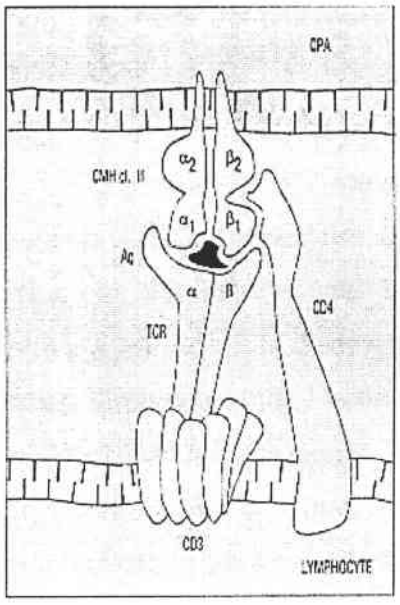


Fig. 8 Reconnaissance de l'antigène par les lymphocytes TCD4 ;
CPA : cellules d'antigènes (D'après Sabbah, Immunologie Clinique; 1994)

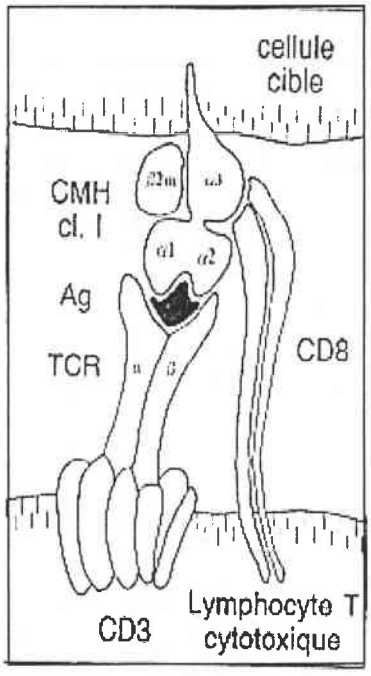


Fig. 9 Reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte TCD8 ;
TCR : récepteur des cellules T (D'après Sabbah, Immunologie Clinique; 1994)

b-3. Les cellules tueuses naturelles : NK (Fig. 10)

Les cellules NK comprennent jusqu'à 15 % des lymphocytes du sang et peuvent être définies par l'absence de récepteur d'antigène (TCR ou Ig). La plupart des antigènes de surface T des cellules NK se retrouvent sur les cellules de la lignée T ou de la lignée myélomonocytaire. Bien que les cellules NK ne portent pas toutes, les marqueurs caractéristiques des lymphocytes B et T (on les appelle d'ailleurs souvent lymphocytes nuls ou non B-non T), elles sont souvent porteuses de certains marqueurs phénotypiques des lignées T. Elles sont aussi porteuses de marqueurs membranaires des monocytes/macrophages, outre le fait qu'elles peuvent être reconnues par les marqueurs qui les caractérisent exclusivement (antigène NK). Cependant, les cellules NK murines, identifiées à l'aide d'alloanticorps ou d'hétéroanticorps, se distinguent des cellules NK humaines par la présence de granules azurophiles de plus grande taille en plus petit nombre. Chez la souris, les cellules NK se présentent comme de grandes cellules mononuclées, d'aspect lymphoblastique plus que monocytaire. Les cellules NK possèdent une activité cytolytique spontanée sur des cellules tumorales d'origines diverses en culture *in vitro*. La sensibilité à l'action cytolytique des cellules NK n'est pas limitée aux cellules malignes : les cellules indifférenciées, les cellules infectées par des virus, certains parasites extracellulaires y sont aussi sensibles.

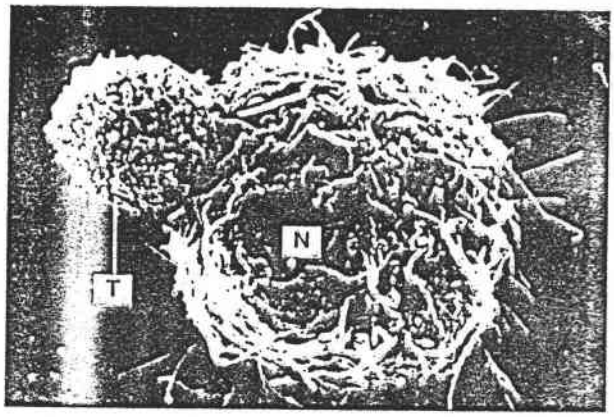


Fig. 10 Cellule NK (N) fixée à une cellule cible (T)

(d'après Roitt, Immunologie ; 1997)

Tableau 1. Marqueurs de surface des cellules NK murines (d'après Roitt, Immunologie, 1997).

Marqueurs	**Expression sur d'autres lignées**
Thy-1	cellules T
Lyb-5 (B220)	cellules B
NK1	-
NK2	-
RFCγIII *	certaines cellules T. granulocytes, certaines monocytes/macrophages
CR3(CD11b,Mac-1)	granulocytes, monocytes
Ly49	cellules T
* exprimé sur quelques cellules NK murines mais non sur toutes	

c. les organes lymphoïdes primaires ou centraux

c-1. La moelle osseuse

La moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse et le lieu de différenciation des lymphocytes B. Les cellules Pro-B et pré-B dérivées des cellules souches CD34+ se multiplient au contact de la travée osseuse et de cellules réticulaires primitives qui jouent un rôle important dans la sécrétion des différentes cytokines nécessaires pour la multiplication et la différenciation cellulaire. Les cellules B matures quittent la moelle en traversant la paroi des sinus veineux (Fig. 11).

c-2. Le thymus

Le thymus des mammifères est un organe blanchâtre, situé à la base du cou. Dans la plupart des espèces, il est formé de deux lobes reliés entre eux par du tissu conjonctif (Fig. 12). Chaque lobule comprend une zone corticale externe contenant la majorité des lymphocytes thymiques, et une zone médullaire centrale plus claire peuplée de thymocytes médullaires. Parmi les thymocytes du cortex, on peut observer des cellules blastiques, en voie de division et des cellules mortes. Le parenchyme est constitué de cellules épithéliales formant un réseau dans lequel on retrouve des thymocytes, des macrophages et des cellules dendritiques d'origine médullaire, essentiellement dans la région de jonction cortico-médullaire. Des corpuscules de Hassal, amas de cellules épithéliales dont le rôle est encore inconnu, sont également visibles dans la zone médullaire.

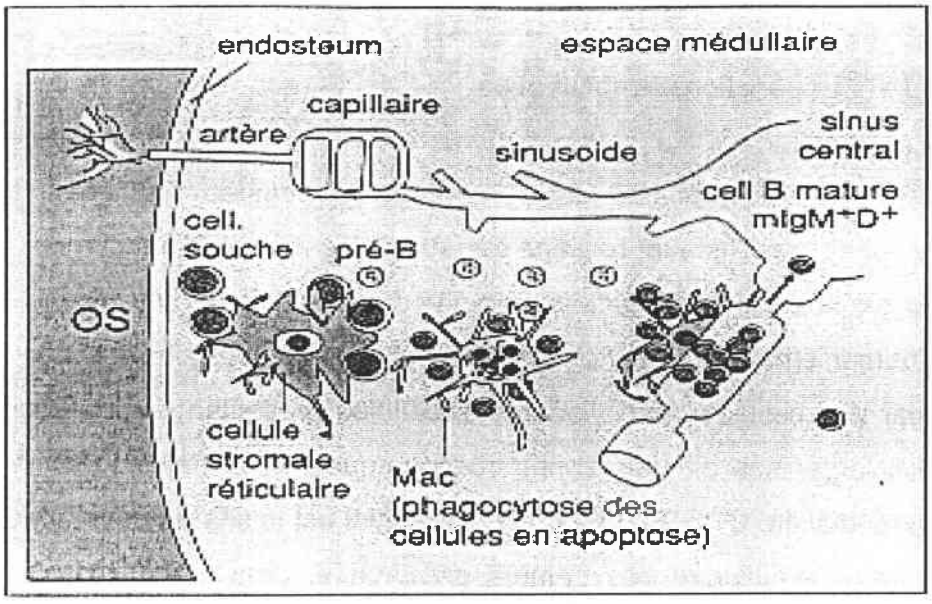


Fig. 11 Représentation schématique de l'hématopoïèse des cellules B dans la moelle osseuse

(d'après Roitt, Immunologie, 1997)

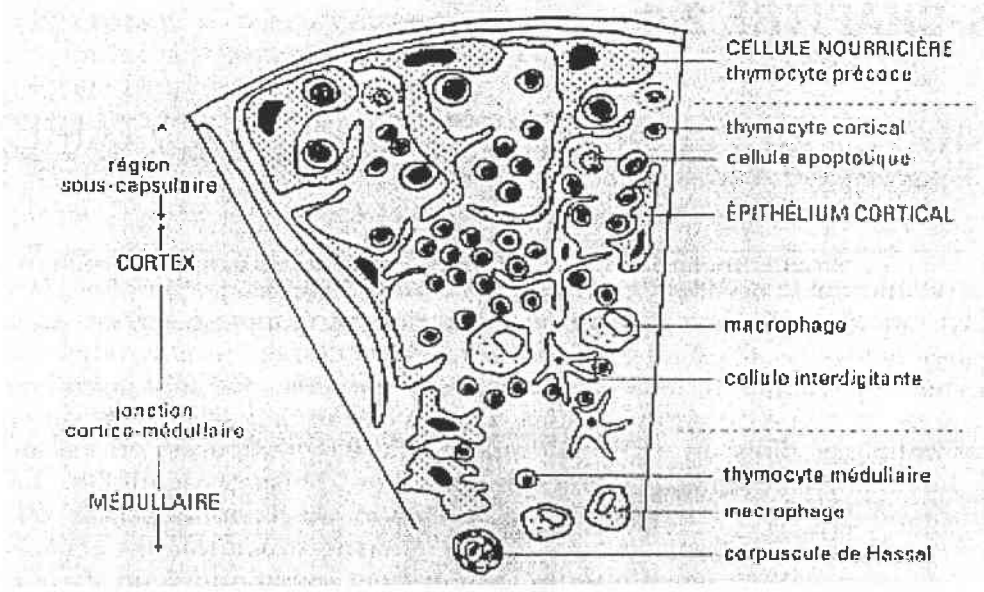


Fig. 12 Structure anatomique du thymus

(d'après Genetet, Immunologie ; 1997)

d. Les organes lymphoïdes secondaires ou périphériques

d-1. Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques sont des formations lymphoïdes disposées le long des vaisseaux lymphatiques. Ils sont le siège des réactions immunitaires dirigées contre des antigènes acheminés par la circulation sanguine ou lymphatique (sous forme de protéine ou de microorganisme); pris en charge sur le site de leur pénétration ou de leur production par des cellules spécialisées; les cellules présentant l'antigène (CPA). Les ganglions sont organisés en trois zones concentriques : le cortex superficiel, le cortex profond et la médullaire (Fig.13). Le cortex superficiel est le site de développement de la réponse anticorps au niveau des centres germinatifs. Dans cette zone, des cellules dendritiques folliculaires présentent l'antigène aux lymphocytes B. Le cortex profond, ou zone paracorticale, est peuplé principalement de lymphocytes T et de cellules interdigitées qui assurent la présentation de l'antigène. La médullaire contient surtout des macrophages et des plasmocytes.

d-2. La rate

La rate est un organe volumineux situé dans la partie supérieure gauche de l'abdomen, à proximité du diaphragme. Elle est très irriguée et reçoit les particules étrangères et les débris cellulaires véhiculés par le sang, dont elle assure l'élimination. La rate est constituée, de deux tissus principaux : la pulpe rouge, impliquée dans l'élimination des érythrocytes sénescents ou altérés, mais aussi lieu de production des anticorps ; la pulpe blanche formant le tissu lymphoïde organisé en manchons autour des ramifications de l'artère splénique (Fig. 14).

La rate est essentiellement impliquée dans la production d'anticorps. Le développement d'une réponse immunitaire se traduit par une augmentation relative de la pulpe blanche, liée à la prolifération des lymphocytes (apparition de lymphoblastes) et la stimulation des centres germinatifs. Certains lymphocytes activés, les pré-plasmocytes, migrent par la zone marginale de la pulpe blanche vers la pulpe rouge, ou les anticorps seront synthétisés par les cellules différenciées en plasmocytes. D'autres migrent via la lymphe et le sang vers les muqueuses ou la moelle osseuse (sites de production des anticorps).

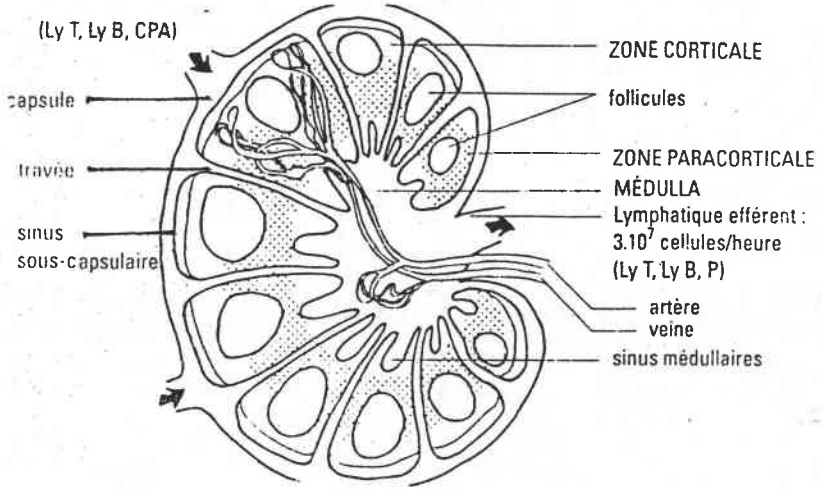


Fig. 13 Structure d'un ganglion lymphatique (N. Genetet, Immunologie ; 1997)

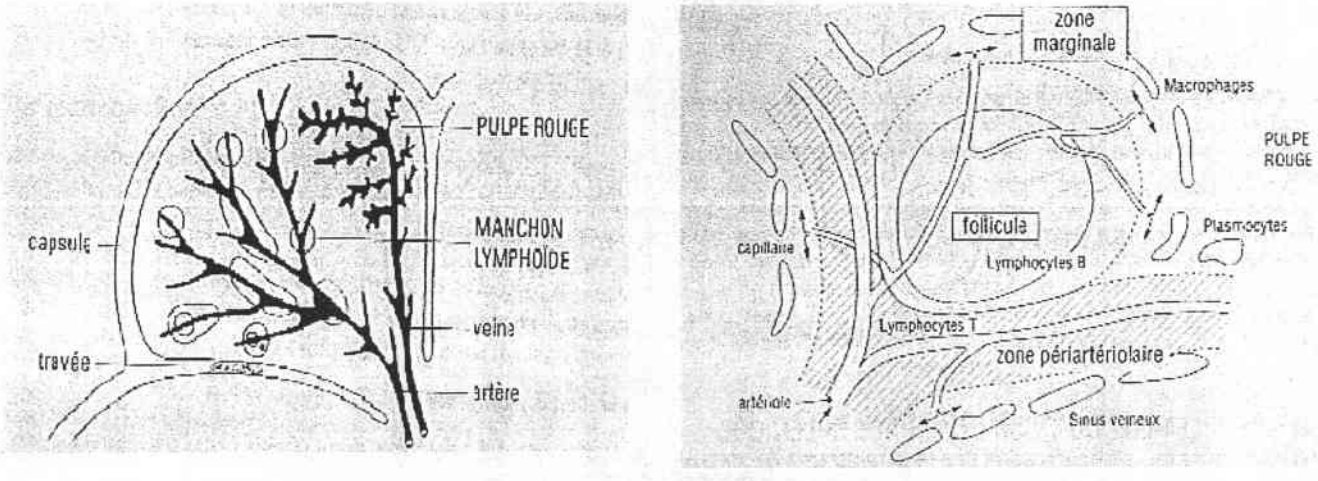


Fig. 14 La rate : a) Tissu lymphoïde de la rate

b) organisation du tissu lymphoïde de la rate (d'après N. Genetet, Immunologie ; 1997)

d-3.Le tissu lymphoïde annexé aux muqueuses

Le tissu lymphoïde est représenté sous forme de cellules disséminées, tissu lymphoïde diffus, ou de formations individualisées, des follicules lymphoïdes tout au long des muqueuses (Fig. 15). Le tissu lymphoïde annexé aux muqueuses fournit les précurseurs des cellules productrices d'IgA, anticorps capables de traverser les muqueuses, donc d'en assurer la protection.

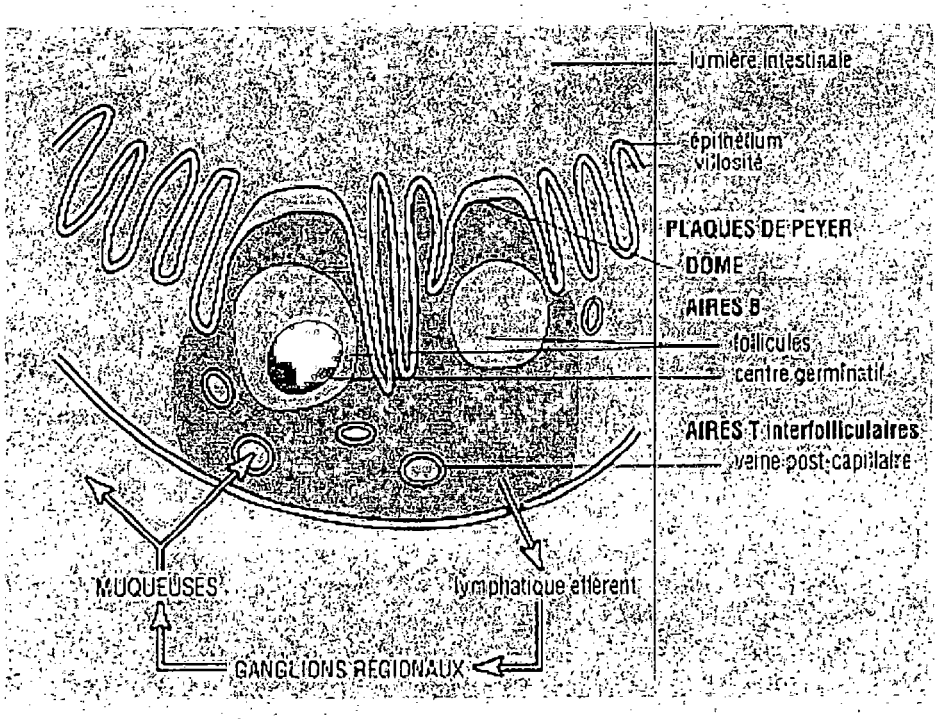


Fig. 15 Tissu lymphoïde muqueux

(d'après Genetet, Immunologie ; 1997)

3-2 Impact du stress aigu et chronique sur la réponse immunitaire :

(les différents modèles utilisés)

3-2-1. Stress dit psychologique

Les travaux de Marsland *et al.*, (1997) ont montré que le pourcentage et la valeur absolue des lymphocytes T CD8 et des cellules NK circulants, augmentent après un stress psychologique aigu, alors que les concentrations des lymphocytes auxiliaires T (CD4) et des lymphocytes B (CD19) ne varient pas. Ces auteurs ont signalé que la diminution des lymphocytes TCD4 et B, est masquée en tenant compte du paramètre de l'hémoconcentration (la réduction plasmatique). Benshop *et al.*, (1993) ont montré que l'augmentation du nombre des cellules T CD8 et des cellules NK est surtout liée d'une part, au détachement des lymphocytes adhérents à l'endothélium vasculaire, ce qui augmente leur nombre au niveau de la circulation sanguine et d'autre part, à leur migration des organes lymphoïdes vers la circulation sanguine. Cependant, l'étude de Patersson *et al.*, (1995) a montré que l'augmentation de la concentration relative des populations sanguines (CD8 et NK) est surtout liée à la réduction du volume plasmatique. Ces mêmes auteurs ont signalé que sous l'effet du stress, la pression artérielle augmente, filtre le fluide hors de la circulation sanguine dans l'espace extra-vasculaire. Ceci augmente la concentration d'un grand nombre de constituants du sang non diffusibles (les protéines, les globules blancs…).

Les travaux de Pariante *et al.*, (1997) ont montré que le stress psychologique chronique (personnes s'occupant d'handicapés) affecte les paramètres immunitaires chez l'homme. Selon cette étude le stress diminue le pourcentage des cellules T (CD3), celui des cellules T auxiliaires (CD4) ainsi que le rapport T auxiliaires/T suppresseurs. Cependant le pourcentage des cellules T cytotoxiques/suppressives (CD8) augmente après l'application du stress. Cette étude a montré aussi que le facteur «âge», agit considérablement sur la tendance des réponses immunitaires des individus stressés.

Ces auteurs ont constaté que le stress chronique chez les personnes âgées déprime d'avantage le pourcentage des lymphocytes T (CD3) et celui des lymphocytes T auxiliaires (CD4). Les travaux de Naliboff *et al*, (1991) ont montré que le stress psychologique aigu (tâches mentales) chez l'homme engendre une augmentation du nombre des cellules NK, celui des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (CD8) dans le sang. Selon cette étude, l'activité cytotoxique des cellules NK augmente chez les populations jeunes, alors que les personnes âgées ne présentent pas de variation de l'activité cytotoxique des cellules NK. D'après cette étude, l'activité cytotoxique des cellules NK est affectée différemment par le stress en fonction de l'âge. Ces travaux ont aussi montré que le stress n'affecte pas significativement le nombre des lymphocytes auxiliaires T(CD4), ni celui des lymphocytes totaux T(CD3), ni celui des lymphocytes B (CD20).

Muldoon *et al.*, (1995) ont montré chez l'homme que le stress psychologique aigu (20 min) augmente le risque de coronopathie. Le rythme cardiaque, la pression artérielle, la cholestérolémie, le taux d'hématocrite, la quantité d'hémoglobine et la concentration totale en protéines ont augmentés chez les sujets stressés. Cette étude a aussi mis en évidence que le stress engendre d'une part, une réduction du volume plasmatique et d'autre part, une augmentation de la viscosité du sang et de la concentration sérique en lipides. Les travaux de Mills *et al.*, (1995) se sont intéressés aux différentes populations lymphocytaires et à la sécrétion des catécholamines après l'exposition à un stress psychologique aigu chez l'homme; l'application du stress augmente: le nombre des cellules NK, des lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs (CD8), des globules blancs ainsi que le taux de l'adrénaline et de la noradrénaline; tandis qu'il diminue le nombre des lymphocytes T CD4, celui des lymphocytes B le rapport TCD4/TCD8. Les travaux de Schedlowski *et al.*, (1993a) ont montré que le stress psychologique (test au parachute chez les débutants) augmente la sécrétion des hormones adrénergiques et surrénaliennes ainsi que le nombre et l'activité des cellules NK; alors que l'altération de la réponse immunitaire apparaît corrélée à une augmentation de la noradrénaline pendant le stress. Cette étude a suggéré que la mobilisation immédiate et rapide des cellules NK comme réponse à ce type de stress est essentiellement due à une efficace adaptation du système immunitaire.

D'autres travaux de Schedlowski *et al.*, (1993b) ont mis en évidence les effets de l'adrénaline et de la noradrénaline sur le nombre des sous-populations lymphocytaires et sur la fonction des cellules NK chez l'homme. Selon cette même étude, l'administration de l'adrénaline entraîne une diminution du nombre des cellules CD3 et celui des cellules T CD4, 5 à 60 min après l'injection de l'adrénaline. Cependant, le nombre et la cytotoxicité des cellules NK augmente considérablement, 5 min après l'injection de l'adrénaline et de la noradrénaline. Schedlowski *et al.*, (1993c) ont porté sur l'évaluation du taux des lymphocytes, de l'activité des cellules NK, des concentrations des catécholamines et du taux du cortisol, avant, pendant et immédiatement après la chute des parachutistes (stress psychologique). Ces auteurs ont constaté une augmentation significative du taux de l'adrénaline et de la noradrénaline pendant la chute et celui du cortisol peu de temps après la chute. Selon ces mêmes auteurs, le nombre des lymphocytes et l'activité des cellules NK augmentent immédiatement après la chute et diminuent d'une façon significative une heure après. Cette étude a suggéré que ces variations sont corrélées aux concentrations plasmatiques de la noradrénaline.

L'étude de Bachen *et al.*, (1992) a montré chez l'homme que le stress psychologique aigu (test de stroop), entraîne une augmentation du nombre des cellules NK, une diminution du rapport TCD4/TCD8 ainsi qu'une réduction de la prolifération des lymphocytes stimulés à la PHA et à la Con-A. Benshop *et al.*, (1994), ont montré que le stress psychologique aigu (tâche mentale), induit une activation du système β-adrénergique, et une augmentation du nombre des cellules NK dans le sang. Ces réponses sont bloquées par l'administration du propranolol (antagoniste β adrénergique). Ceci montre bien l'implication des mécanismes β adrénergiques dans le contrôle de l'augmentation du nombre et de l'activité des cellules NK dans le sang. Cette étude a montré que le blocage des récepteurs β adrénergiques, empêche la mobilisation des cellules NK des sites de stockage vers le sang circulant. Ceci a été confirmé en partie par l'étude de Bachen *et al.*, (1995), pour laquelle l'altération de la réponse immunitaire après l'exposition à un stress mental aigu, est dépendante de l'activation du système nerveux sympathique.

3-2-2. Stress par contention

Okimura & Nigo, (1986) ont réalisé des travaux sur des souris stressées par immobilisation, 12 heures (durant la nuit) pendant deux jours successifs et immunisées par des SRBC, le nombre des lymphocytes est déterminé par la technique des plages d'hémolyse «PFC: Plaque Forming Cell» quatre jours après l'immunisation. Cette étude a montré que le nombre des lymphocytes ainsi que le titre d'anticorps dirigés contre les globules rouges de mouton diminuent chez les animaux immunisés après l'application du stress. Alors que l'immunisation avant l'exposition au stress, ne provoque pas de variation au niveau du taux des PFC formés.

Rinner *et al*, (1992) ont comparé les effets d'un stress doux (Manipulation de l'animal) et d'un stress sévère (immobilisation) sur le taux des catécholamines, de l'ACTH, de la corticostérone ainsi que sur les fonctions *in vitro* des lymphocytes chez le rat. Ils concluent que les changements observés au niveau des lymphocytes du sang périphérique (PBL: Peripheral Blood Lymphocytes) dépendent de l'intensité de l'agent stressant: un stress à court-terme (manipulation de l'animal pendant 1 min) induit une augmentation de la prolifération des PBL (technique de culture cellulaire en utilisant de la thymidine radioactive). Alors que l'immobilisation provoque plutôt une suppression de la prolifération de ces populations lymphocytaires en fonction de la durée du stress appliquée. La diminution provoquée après 120 min d'immobilisation est réversible 24 h après et peut être largement prévenue par une surrénalectomie, ceci démontre bien l'implication des facteurs libérés par cette glande dans l'immunosuppression induite après l'application du stress. Cependant, la prolifération des lymphocytes spléniques a plutôt augmentée après l'immobilisation et la surrénalectomie. Cette étude montre bien que le stress affecte les compartiments du système immunitaire par le biais de différents mécanismes.

Millan *et al*, (1996) ont étudié les effets du stress (réduction de l'espace) appliqué à court et à long terme, sur l'immunité cellulaire et humorale chez le rat. Les deux types de stress augmentent significativement la concentration plasmatique de la corticostérone. Selon cette étude, le stress appliqué à court et à long terme diminuent le nombre des

leucocytes périphériques et celui des cellules mononucléaires spléniques. Alors que les deux types de stress n'engendrent pas de variation au niveau de la prolifération des lymphocytes spléniques après une stimulation à la Con-A.

3-2-3. Stress par rotation

Les travaux de Esterling *et al.*, (1987) ont montré l'existence d'une interaction entre le stress et le système immunitaire au niveau des lymphocytes T. Selon ces travaux, le stress, consistant en une rotation des souris par groupe de 5 pendant 10 min, est appliqué le jour même de l'immunisation par des globules rouges de mouton et 24 heures après l'immunisation. Les souris sont ensuite sacrifiées quatre jours après l'immunisation, la rate est prélevée et le nombre des lymphocytes T est déterminé par la technique de formation de PFC. Une diminution de 50 % du nombre des lymphocytes spléniques est observée quand le stress est appliqué 24 heures après l'immunisation, alors que ce nombre n'est pas modifié lorsque le stress est appliqué aux souris, immédiatement après l'immunisation. Ces mêmes travaux ont mesuré le taux d'anticorps totaux par la technique d'hémagglutination chez des souris surrénalectomisées (la surrénalectomie est faite deux semaines avant l'immunisation) et chez des souris normales stressées 24 heures après l'immunisation, objectivant ainsi une importante réduction du titre d'anticorps totaux chez les souris non surrénalectomisées et peu de variation chez les souris qui ont subi la surrénalectomie. Ceci est expliqué par l'effet immunosuppresseur des glucocorticoïdes, qui inhibent la circulation des lymphocytes dans le sang et par conséquent, provoque une diminution du taux d'anticorps.

Les travaux de Li *et al.*, (1997), ont montré chez des souris inoculées par des cellules tumorales (syngenic B16 melanoma), et exposées au stress de rotation (tubes à centrifugation de façon répétitive), une diminution des cellules $TCD4^+$ anti-tumorales de type Th1, ainsi que la production de l'INFγ et celle de l'IL-2, alors que la production de l'IL-4 n'a pas été affectée. Ces auteurs ont signalé d'une part, que l'activité des cellules NK spléniques n'est pas modifiée après l'application du stress.

D'autres part, la sensibilité de ces cellules à un stimulateur mitogénique, diminue après l'exposition au stress. Selon ces mêmes auteurs, une administration *in vivo* des glucocorticoïdes (la déxametasone) chez les animaux non stressés, engendre une diminution de la production de l'INFγ et de l'IL-2 ainsi qu'une réduction de la prolifération des cellules cytotoxiques (CTLs) spléniques anti-tumorales.

3-2-4. Stress par privation de la boisson et de la nourriture: *stress psychophysiologique*

Les travaux de Jessop *et al.*, (1987) ont montré que des rats assoiffés et isolés (la privation d'eau et l'isolement social constituent une forme de stress psychophysiologique), présentent une augmentation de la prolifération des lymphocytes après une stimulation à la PHA en comparaison à des rats vivants en groupe (5 par cage), et bénéficiant de la boisson et de la nourriture à volonté. Le nombre des lymphocytes totaux dans le sang augmente significativement après 5 semaines d'isolement. Quand les animaux subissent la combinaison des deux traitements pendant 12 semaines, à la fois les lymphocytes du sang et de la rate augmentent respectivement d'un facteur de 3 et de 2, alors que la concentration des glucocorticoïdes reste inchangée. Par contre, les auteurs ont constaté que 48 heures après l'isolement, la réponse des lymphocytes est réduite de 60% par rapport aux rats vivant en groupe. Cette étude montre, 48 heures après, une diminution de l'activité immunitaire cellulaire. Les mécanismes intervenant dans la diminution de la réponse immunitaire après l'application du stress restent inconnus et dépendent principalement de la durée d'exposition à l'agent stressant.

3-2-5. Stress par exercices physiques

Les travaux de Hoffman & Pedersen, (1994) ont montré que l'exercice physique influence l'immunité naturelle, les fonctions des cellules T et B, les réponses des cytokines en modifiant les paramètres hémodynamiques ainsi que les effets des hormones endocriniennes, sécrétées, lors d'un stress physique.

Les effets sur le système immunitaire dépendent de l'intensité, la durée, la chronicité de l'exercice physique, le temps de l'évaluation immunitaire ainsi que de la variabilité individuelle. La concentration des neutrophiles augmente et continue à augmenter après l'exercice physique. Le nombre total des lymphocytes et des cellules NK augmente également, les lymphocytes B et T sont mobilisés dans la circulation sanguine. Cependant, le rapport CD4/CD8 diminue. Selon cette étude, l'exercice physique induit une cascade de réponses hormonales. D'une part, la dépolarisation des nerfs splanchniques sympathiques innervant la médullosurrénale aboutit à la libération de l'adrénaline et de la noradrénaline dans le plasma, ces neurohormones ont des effets physiologiques sur le rythme cardiaque, sur le tonus vasomoteur, sur le flux sanguin dans le tissu lymphoïde ainsi que sur la circulation des leucocytes. D'autres part, l'activation de l'axe HPA durant l'exercice provoque une sécrétion de l'ACTH, et par conséquent, une libération des glucocorticoïdes dans la circulation sanguine: les glucocorticoïdes ont des effets potentiellement immunosuppresseurs sur les cytokines, sur les macrophages, sur les monocytes ainsi que sur les cellules NK.

3-2-6. Stress par chocs électriques

Les travaux de Zalcman *et al.*, (1988) ont montré chez la souris que le stress sous forme de chocs électriques diminue la réponse des plages d'hémolyse (PFC) 48 heures après l'immunisation avec des globules rouges de mouton. Alors que, la réponse « PFC » ne change pas chez les animaux stressés 24 heures et 95 heures après l'immunisation avec des globules rouges de mouton. Cette même étude a montré que le stress diminue la prolifération de la réponse des lymphocytes T et B et réduit aussi la cytotoxicité des cellules NK spléniques. Par conséquent, la vulnérabilité aux agents pathogènes augmente. L'activité des cellules NK et la prolifération des splénocytes à la suite d'une stimulation mitogénique ont été étudiées par Millar *et al*, (1993) chez des rats exposés aux chocs électriques évitables et inévitables. Les animaux exposés à des chocs évitables présentent une activité cytotoxique des cellules NK plus élevée que celle des non stressés et que celle des animaux exposés à des chocs inévitables. Selon ces auteurs, la prolifération des splénocytes est augmentée significativement chez les rats exposés à des chocs évitables par rapport à ceux stressés de façon inévitable.

Cependant, la prolifération des lymphocytes périphériques, est supprimée de 50 % chez les animaux stressés par des chocs inévitables par rapport aux animaux stressés par des chocs évitables. L'étude de Batuman *et al.*, (1990), a montré chez le rat que le stress répétitif (immobilisation et chocs électriques) pendant 7 j et 14 j consécutifs, induit une réduction du nombre des cellules mononucléaires, particulièrement les cellules TCD8 suppressives/cytotoxiques spléniques et périphériques. Cette étude a montré aussi que la production de l'IL-2 ainsi que la prolifération des cellules T après une stimulation à la Con-A et à la PHA, diminuent après l'exposition au stress.

D'autres travaux de Zalcman *et al*, (1991), ont montré que le stress sous forme de chocs électriques inévitables chez trois lignées de souris (C57BL/6j, C3H/HeJ et BALB/cByj), induit une diminution de l'activité des cellules NK ainsi que le taux des catécholamines centraux. La cytotoxicité des cellules NK est déterminée à différentes durées (30min, 24h ou 48 h) après le déclenchement des chocs électriques inévitables. Ces auteurs ont montré que la cytotoxicité des cellules NK est remarquablement diminuée chez C57BL/6J, 30 min et 48h après l'exposition au stress. Cet effet est significatif chez la lignée C3H/HeJ entre 24 et 48 h après l'application du stress. Cependant l'activité des cellules NK est significativement réduite 24 h, après l'application du stress chez la lignée BALB/cByj.

Kusnecov *et al.*, (1992) ont établi une corrélation entre l'infection virale (HSV : Herpes Simplex Virus) des souris stressées par des chocs électriques et la réponse immunitaire humorale et cellulaire. Ces travaux ont montré que les chocs électriques provoquent une diminution de l'immunité spécifique à l'HSV. Selon ces mêmes travaux, il a été relevé chez des souris stressées, une dépression spécifique de la réponse des lymphocytes CTL observée aussi bien au niveau de la rate qu'au niveau des ganglions lymphatiques. Le taux des anticorps IgM anti-HSV a aussi diminué d'une façon significative chez les souris stressées. Ces différentes diminutions sont corrélées à une augmentation significative du titre du virus HSV chez les souris stressées par les chocs électriques.

3-3 Stress et immunité humorale

Les travaux de Laudenslager *et al.*, (1988) ont révélé une différence de la production d'anticorps chez des animaux immunisés par KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) et stressés (chocs électriques pendant deux semaines successives), soit pendant la phase obscure ou claire de leur cycle. En effet ces auteurs ont observé une importante production d'anticorps spécifiques IgG anti-KLH, lorsque le choc électrique est appliqué pendant la phase obscure, contrairement au faible taux d'anticorps IgG anti-KLH trouvé chez des animaux stressés pendant la phase claire. Ces auteurs ont suggéré deux hypothèses pour expliquer cette différence :

- Au moment de l'immunisation par l'injection de l'antigène, pendant la phase obscure (au moment ou` le taux de la corticostérone est élevé), un grand nombre de lymphocytes B, T et des macrophages sont probablement séquestrés au voisinage des ganglions lymphatiques, ce qui expliquerait la protection des lymphocytes contre l'effet inhibiteur des glucocorticoïdes.

- L'antigène aurait probablement un effet plus efficace pendant la phase obscure et la production d'anticorps se mettrait en place pendant cette phase.

D'autres travaux de Berkenbosch *et al.*, (1991) ont montré que le stress (contention et chocs électriques), provoque une hausse de la réponse immunitaire humorale en impliquant par voies directes ou indirectes le CRF chez le rat. Selon cette étude, la neutralisation du CRF (injection d'anticorps anti-CRF) prévient l'augmentation du taux de l'ACTH, celui de l'adrénaline et celui de la noradrénaline. Ces auteurs ont démontré l'implication de l'ACTH et d'autres peptides sous le contrôle du CRF, dans la modification de la réponse humorale splénique chez les animaux stressés.

Les travaux de Baldwin *et al.*, (1995) ont étudié les effets du stress (Nage forcée 60min/j pendant 3 à 5j) sur l'immunité humorale des rats isolés. Cette étude a montré chez des rats soumis au stress expérimental (nage forcée), une hypertrophie des glandes surrénales et une réduction du poids du thymus et de la rate comparé à des rats non stressés. Cependant les deux types de stress n'affectent pas le titre d'anticorps dirigés contre les SRBC. Ces auteurs ont aussi observé chez les animaux isolés (1animal/cage), une augmentation du pourcentage des lymphocytes, du taux de la

corticostérone ainsi que celui du glucose en comparaison à des animaux stressés (nage forcée). Cette étude a révélé que la réduction de contact social suivi d'une exposition à un stress physique (nage forcée), n'entraîne pas de changement au niveau de la réponse immunitaire. D'autres travaux de Baldwin *et al.*, (1997), ont comparé les effets de deux types de stress (Physique « course » *versus* psychologique « immobilisation ») sur les réponses humorales et endocriniennes chez les rats (male et femelle). Les résultats de cette étude ont révélé que le stress psychologique et combiné (psychologique et physique) augmentent le titre d'anticorps dirigés contre les SRBC, le pourcentage des lymphocytes périphériques ainsi que le taux de la corticostérone et de la noradrénaline plasmatiques chez la rate. Ces mêmes auteurs ont montré que l'activation de l'axe HPA pendant le stress est dépendante du sexe.

Banerjee *et al.*, (1997) ont montré chez la souris que l'exposition au DDT (insecticide) à des concentrations de 20, 50 ou 100 ppm pendant 4 semaines, n'affecte pas la réponse primaire des anticorps dirigés contre les SRBC. Alors qu'un prétraitement au DDT des animaux stressés par contention appliqué à court terme et à long terme, provoque une réduction du titre d'anticorps anti-SRBC comparé aux animaux non stressés et non traités au DDT. Selon cette étude, les effets les plus immunosuppresseurs du DDT sur le titre d'anticorps anti-SRBC et sur le taux des PFC spléniques sont observés à des doses de 50 et 100 ppm en combinaison à un stress de contention intense (24 h) ou un stress appliqué à long terme (1h pendant 5 j). Les résultats de cette étude ont mis en évidence les différentes interactions existantes entre les agents stressants physiques et environnementaux dans la régulation de la réponse immunitaire à médiation humorale chez la souris.

3-4 Interactions des hormones dites de stress avec la réponse cellulaire Th1 et Th2 et avec les cytokines pro/anti-inflammatoires

Les travaux de Elenkov & Chrousos, (1999) ont montré que le stress fait intervenir les hormones dites de stress, les glucocorticoïdes (cortisol) et les catécholamines (adrénaline et noradrénaline). Ces dernières exercent leurs effets sur les cellules T auxiliaires (Th_1 et Th_2) et sur la production des cytokines de type 1 et de type 2. Ces auteurs ont aussi montré que le stress aigu induit des activités pro-inflammatoires dans

certains tissus via l'activation de la CRH et de l'histamine sécrétée par les mastocytes. Selon cette même étude, le traitement conjugué par des antagonistes β_2 adrénergiques et Histaminiques H_2, amplifie la réponse cellulaire de type Th_1, qui peut contribuer positivement dans l'amélioration de certaines infections ou tumeurs. Ces auteurs ont aussi suggéré que le traitement par des antagonistes du CRH, prévient l'immunosuppression de la réponse Th_1 induite par le stress. D'autres travaux antérieurs de Elenkov *et al.*, (1996), ont montré chez l'homme que les glucocorticoïdes inhibent la production de l'IL-12 en agissant directement au niveau de leurs récepteurs cytoplasmiques/nucléaires qui se trouvent au niveau des CPA, et ceci affecte la balance Th_1/Th_2. Ces mêmes travaux ont montré aussi que les glucocorticoïdes exercerait un effet suppresseur direct sur les cellules de type Th_1.

3-5 Stress, HIV et cancer

3-5-1. Stress et HIV

Les travaux de Famularo *et al.*, (1997) ont montré que l'HIV engendre indirectement le suicide cellulaire ou la mort programmée, l'apoptose, ce qui va entraîner une diminution du nombre des cellules dans le sang. Les résultats de cette étude affirment que les facteurs régulant les effets négatifs de ce virus sur l'immunité sont surtout liés à la balance oxydant/antioxydant du système redox cellulaire ainsi qu'à la production du TNF. Cette étude recommande aux patients séropositifs, de combiner un traitement antirétroviral avec des drogues antioxydantes dont l'activité anti-apoptotique a été mise en évidence par cette équipe.

Les travaux de Nair *et al.*, (1995) se sont intéressés particulièrement à l'impact des hormones dites de stress sur la progression de l'infection à l'HIV. Ces mêmes auteurs ont développé un modèle *in vitro* pour évaluer les effets des hormones de stress tels que : le cortisol, l'ACTH et la β endorphine sur la progression de la maladie et particulièrement sur l'activité des cellules NK. Selon cette étude, l'administration exogène et directe de la β endorphine sur une mixture de cellules immunitaires, n'affecte

pas l'activité des cellules NK, alors que le cortisol et l'ACTH, inhibent l'activité de ces cellules chez les patients infectés par l'HIV. Cette étude a mis en évidence l'implication des neurohormones dans l'évolution de la maladie du SIDA.

3-5-2. Stress et cancer

Les travaux de Wu *et al.*, (2000) ont montré l'impact du stress psychosocial (isolement social) sur la formation des métastases du foie chez la souris Balb/c après une injection de cellules cancéreuses de type: colon 26-L5. Pour ces auteurs, l'isolement social augmente le nombre des colonies tumorales par rapport aux animaux vivant en groupe. Un isolement de ces animaux durant 2 semaines engendre une diminution du poids du thymus (35.8 %) ainsi que le nombre des thymocytes (40.2 %). Selon cette étude, le stress affecte aussi la réponse des splénocytes à divers stimuli, l'activité splénique des cellules NK, la cytotoxicité des macrophages ainsi que l'activité tumoricide des macrophages. Elle fait apparaître que le stress psychosocial potentialise la formation des métastases tumorales, en partie à travers ses effets suppressifs sur le système immunitaire. Les études de Rowse *et al.*, (1995) ont montré chez la souris que le stress psychologique (isolement) affecte la vitesse de croissance des tumeurs mammaires (SC115) et l'activité des cellules NK spléniques; l'isolement des souris (vivant en groupe au départ) juste après l'injection des cellules cancéreuses, entraîne une augmentation de la vitesse de croissance de la tumeur et l'activité des cellules NK; alors que la vie en groupe des animaux vivant seul au départ diminue à la fois la taille de la tumeur et l'activité des cellules NK. Ces travaux ont révélé l'importance du rôle des cellules NK dans la croissance de la tumeur observée chez les animaux isolés. Ogawa *et al.*, (2000) se sont intéressés plutôt à l'étude des effets du stress postopératoire sur la réponse immunitaire des cancéreux (cancer gastro-intestinal). D'après eux le stress chirurgical induit une diminution du nombre des lymphocytes périphériques ainsi que leurs fonctions deux semaines après l'intervention chirurgicale.

L'immunosuppression est due à une diminution du nombre des lymphocytes T auxiliaires/inducteurs, celui des cellules cytotoxiques et celui des cellules NK. Ces auteurs observent en outre que ce type de stress augmente la sécrétion du cortisol et des protéines acides chez les patients atteints du cancer.

4. Stress et axes corticotrope/sympathique

4-1. *La glande surrénale*

4-1-1. Description générale

Les glandes surrénales sont des organes pairs situés au pôle supéro-interne des reins. De forme variable selon les espèces, le plus souvent "en tricorne", chaque surrénale est composée de quatre glandes emboîtées les unes dans les autres. Du centre vers la périphérie, on trouve: la médullosurrénale, embryologiquement distincte du reste de la glande, la corticosurrénale, elle même formée de trois zones concentriques ayant chacune un équipement enzymatique spécifique et un rôle physiologique particulier.

4-1-2. Les corticosurrénales

- Aperçu anatomique (voir Fig. 16)

On distingue de la périphérie vers le centre: la zone *glomérulée* productrice d'aldostérone (hormone minéralocorticoïde), la zone *fasciculée* en continuité avec une zone *réticulée* respectivement responsables des sécrétions de glucocorticoïdes et d'androgènes (Malamed 1975; Waterman & Simpson 1990).

* ***La zone glomérulée***, ainsi nommée car les travées sont pelotonnées sur elles mêmes et recourbées en arc ou en croix, donnant de nombreux point un aspect de pseudo-glomérules, est constitué de petites cellules, très polymorphes, cubiques ou arrondies, et dont le protoplasme peu coloré contient des granulations lipoïdes. Elle sécrète l'aldostérone.

* ***La zone fasciculée***, plus importante, est formée de grande cellules polyédriques disposées en travées parallèles (Colonnes de Kölliker) qui vont de la périphérie vers le centre de la glande. Leur cytoplasme est riche en gouttelettes graisseuses contenant des lécithines et du cholestérol précurseur des hormones : c'est la partie moyenne de la zone fasciculée. Sa partie externe comporte une mince couche de cellules plus petites, ou` l'on retrouve quelques figures de mitoses.

* ***La zone réticulée***, couche la plus interne, est faite de cordons de cellules cubiques anastomosées en réseau. Entre les cellules, courent de nombreux capillaires fortement dilatés.

Les zones fasciculées et réticulées sont responsables de la biosynthèse et de la sécrétion des glucorticostéroïdes et des androgènes.

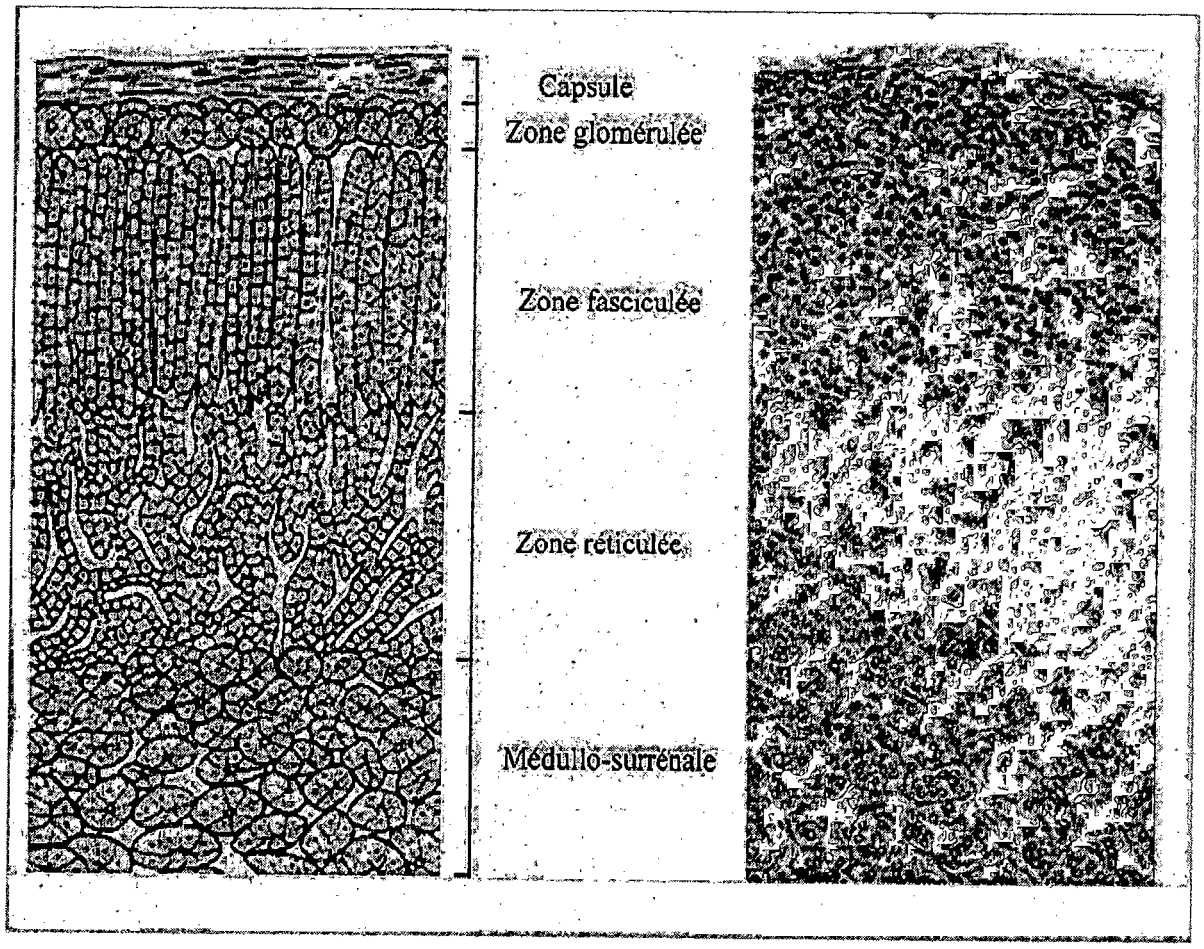


Fig. 16 Structure microscopique de la glande surrénale

(a) schéma. (b) Photographie d'une coupe transversale de la glande surrénale. On aperçoit la cortico-surrénale et une partie de la médullo-surrénale (cité dans la thèse de Moftaqir-Handaj. A, 1997)

- Hormones de la corticosurrénale

La corticosurrénale sécrète trois types d'hormones : les glucocorticoïdes, dont le chef de file est le cortisol, les minéralocorticoïdes, assurant la régulation de l'équilibre hydrominéral et dont le plus actif est l'aldostérone, enfin les androgènes. Compte tenu de l'intérêt porté aux glucocorticoïdes dans cette étude, nous présenterons dans un paragraphe indépendant quelques considérations (structure, biosynthèse, transport, catabolisme) sur ces hormones sans évoquer les minéralocorticoïdes et les androgènes. Puis, nous discuterons certaines propriétés physiologiques de ces hormones.

4-1-2-1. les glucocorticoïdes

Dans l'espèce humaine, le principal représentant de ce groupe est le cortisol devançant de loin la corticostérone, produite en quantité 6 à 8 fois inférieure à celle du cortisol par le cortex surrénalien. Cependant, chez les rongeurs de laboratoires, la corticostérone est au contraire le glucocorticoïde le plus abondant (Cohen, 1973).

- Structure

Comme tous les stéroïdes, les glucocorticoïdes dérivent de la structure cyclo-penténo-phénanthrénique. C'est une structure constituée de trois cycles de cyclohexane et d'un cycle de cyclopentane dans un même plan, des groupements fonctionnels se projetant sur l'un ou l'autre côté du plan de la structure principale (Fig. 17). Le cortisol, stéroïde en C21, possède sur le carbone 17 de sa structure un hydroxyle qui le différencie de la corticostérone ou` il fait défaut.

- Biogenèse

La biosynthèse des hormones surrénales de nature stéroïdique a lieu dans les trois zones histologiques, à partir du cholestérol, par un ensemble de réactions biochimiques formant un tronc commun. (Fig. 18)

Le cholestérol vraisemblablement plasmatique, grâce à deux hydroxylases NADPH dépendantes, est transformé en 20 a, 22 (a ou b) dihydroxycholestérol. Celui ci, scindé par une desmolase, donne un composé en C21, la Δ5-prégnénolone. Celle-ci subit ensuite une oxydation en C3 avec isomérisation de la double liaison qui passe de D5 à D4. Ensuite, intervient une série d'hydroxylations en C17 puis en C21 et enfin en C11.

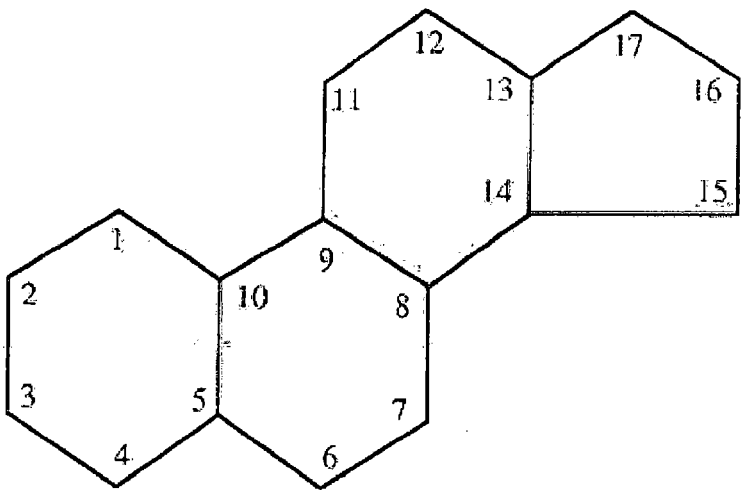


Fig. 17 Structure de base des stéroïdes

Elle est composée de trois cycles de cyclohexane et d'un cycle de cyclopentane.
Les atomes de carbone sont numérotés pour identifier les groupes fonctionnels.
(cité dans la thèse de Moftaqir-Handaj. A, 1997)

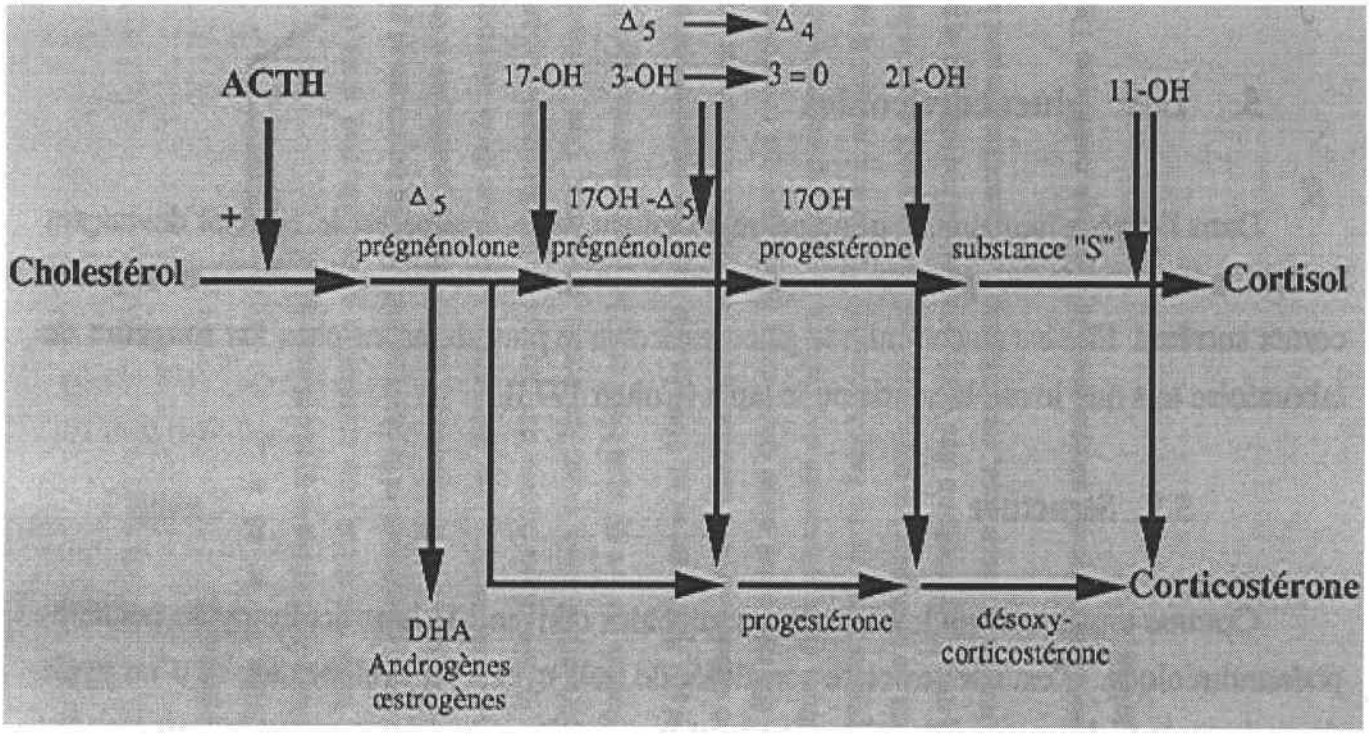


Fig. 18 Principales chaînes de biogenèse des glucocorticoïdes.

(cité dans la thèse de Moftaqir-Handaj. A, 1997)

- Transport

Après leur formation, les glucocorticoïdes sont libérés dans le sang circulant et sont fixés à 90 % sur une protéine porteuse de type α glycoprotéine d'origine hépatique, la transcortine ou la CBG (Corticosteroid Binding Globulin). Ils peuvent rester sous forme libre, forme quantitativement peu importante. Dans les hypercorticismes, la transcortine est rapidement saturée et la fixation s'opère alors de façon non spécifique sur les sérumalbumines.

- Catabolisme

Le métabolisme des hormones stéroïdes se fait dans le foie par le biais d'une série de réductions donnant lieu à des dérivés di, tétra et hexahydrogénés. Ensuite, ils sont principalement éliminés par voie urinaire (par sulfoconjugaison et surtout glucuroconjugaison). Une partie du cortisol non dégradé est éliminée sous forme libre.

- Mise en jeu et régulation de la sécrétion des glucocorticoïdes

La sécrétion des glucocorticoïdes est sous la dépendance du complexe hypothalamo-antéhypophysaire. Ce complexe subit lui même une régulation hippocampique via les projections qu'il reçoit (Jacobson & Sapolsky, 1991). En effet, l'hypothalamus exerce un contrôle par l'intermédiaire d'une neurohormone le CRF, peptide de 41 acides aminés qui stimule au niveau de l'antéhypophyse, les cellules sécrétrices de l'ACTH. De plus, le système hypothalamique est responsable de la nature circadienne de tout le fonctionnement sous-jacent (Daly & Evans, 1974), ainsi que de son adaptation aux stimulations extérieures tels que le stress de toutes ses formes. Sous l'effet du stimulus physiologique représenté par l'ACTH hypophysaire, le cholestérol emmagasiné dans les zones fasciculées et réticulées des cortico-surrénales entre dans la voie de la biosynthèse hormonale. Ainsi, en se fixant sur un récepteur membranaire, l'ACTH provoque une activation de l'adénylate cyclase et une cascade de réactions aboutissant à l'activation des enzymes de biosynthèse des glucocorticoïdes. L'ACTH hypophysaire dérive de la **P**ro-**O**pio-**M**élano-**C**ortine (POMC) dont le clivage protéolytique peut également engendrer d'autres peptides tels que les endorphines ou la MSH (**M**elanocyte **s**timulating **H**ormone). En dehors de son effet sur la stéroïdogenèse, l'ACTH exerce également une fonction d'ordre trophique: l'hypophysectomie entraîne l'atrophie des surrénales. Cependant une rétroaction négative exercée par le cortisol sur l'hypothalamus et l'antéhypophyse régule l'activité de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

L'essentiel de cette régulation s'effectue pendant la nuit, engendrant ainsi un rythme d'activité circadienne.

- Action des glucocorticoïdes

C'est un glucocorticoïde dont l'action essentielle se fait sur le métabolisme des glucides, il stimule la gluconéogenèse. Le cortisol a également un effet activateur du métabolisme protéique. Le cortisol a un effet important sur le catabolisme des protéines. Par ailleurs, le cortisol est connu pour activer la glycogène synthétase et inhiber la glycogène phosphorylase par inhibition de la phosphatase de la phosphorylase α. De plus, il exerce sur les tissus périphériques un effet anti-insuline, sur le muscle squelettique par exemple: Le cortisol agit sur les cellules chromaffines en activant la transmethylase de la noradrénaline (qui catalyse la réaction noradrénaline→adrénaline).

Sur le plan immunitaire, les glucocorticoïdes à des doses modérées et élevées entraînent une diminution du nombre de globules blancs, d'éosinophiles et des lymphocytes circulants dans le sang en même temps qu'une fonte d'organes lymphoïdes. Cependant, les glucocorticoïdes entraînent une augmentation du taux des monocytes, l'activation des macrophages et la stimulation de l'activité des cellules NK due à un blocage de la production endogène de l'interféron (Munck *et al.*, 1984).

4-1-3. La médullosurrénale

La médullosurrénale appartient au système nerveux sympathique. Elle peut être assimilée à un ganglion au sein duquel les neurones postganglionnaires se sont différenciés en cellules endocrines, les médiateurs (adrénaline et noradrénaline) étant déversés non plus dans un espace synaptique mais dans la circulation.

4-1-3-1. Rappel anatomique

Occupant la partie centrale des glandes surrénales, les cellules polyédriques qui la constituent sont dites chromaffines car elles renferment dans leur cytoplasme des granules se colorant par les sels de chrome. Un vaste système vasculaire représenté surtout par les rameaux provenant de la grande veine surrénale, est situé entre le réseau formé par les cellules chromaffines. La médullosurrénale est constituée par deux grands types cellulaires: les cellules chromaffines (majoritaires) et les neurones ganglionnaires. Les cellules chromaffines sont divisées en cellules adrénergiques et en cellules noradrénergiques (Coupland, 1989 ; Kobayashi & Coupland, 1993). Ce sont de petites cellules ne possédant pas d'extensions dendritiques. Les neurones ganglionnaires sont des cellules beaucoup plus grandes possédant des expansions dendritiques. Leur sécrétion principale est la noradrénaline. Il existe une troisième population minoritaire de cellules catécholaminergiques dont la morphologie est intermédiaire entre les cellules chromaffines et les neurones ganglionnaires appelés cellules SIF (**S**mall **I**ntensley **F**luorescent). Elles diffèrent des cellules chromaffines par l'existence de petits prolongements et de granules de sécrétion plus petits (Tischler & Delellis, 1988). D'autres cellules existent aussi au niveau de la médullosurrénale, les cellules satellites ou encore cellules de Schwann (Cooper *et al.*, 1990). Ces cellules joueraient le rôle de support et de jonction entre les cellules.

4-1-3-2. Les catécholamines (CA)

Les CA sont des substances possédant une fonction amine et deux fonctions phénol. Les CA physiologiques : adrénaline, noradrénaline et dopamine sont les intermédiaires chimiques, les médiateurs entre les terminaisons nerveuses et les organes périphériques. Il existe à peu près 80 à 90 % d'adrénaline au niveau de la médullosurrénale. Au niveau des terminaisons nerveuses sympathiques, on trouve uniquement de la noradrénaline ou elle joue un rôle important dans la médiation trans-synaptique.

- Biosynthèse

Le voie de biosynthèse des CA se fait à partir de la L-tyrosine fournie soit par l'alimentation, soit par l'hydroxylation de la phénylalanine dans le foie. Elle est recaptée dans le sang ou`elle se trouve, par les cellules chromaffines par le biais d'un transport actif. L'hydroxylation de la tyrosine conduit à la 3, 4-dihydroxyphénylalanine ou DOPA. C'est l'étape limitante de la biosynthèse, car toute inhibition de l'hydroxylase retentit sur la quantité d'adrénaline produite et sur son stockage. La réaction qui suit se produit grâce à L-acide aminé aromatique décarboxylase : cette enzyme décarboxyle la L-dopa en L-dopamine. La L-dopamine subit une β hydroxylation qui la transforme en noradrénaline par la dopamine β-hydroxylase, qui a comme cofacteur, l'acide ascorbique et le cuivre. Quant à la transformation de la noradrénaline en adrénaline, elle s'effectue dans la médullosurrénale grâce à une méthyl-transférase (Fig. 19).

- Stockage et libération

Les CA sont stockées dans les cellules de la médullosurrénale dans des granules qui contiennent également des protéines solubles, les chromogranines, une ATPase Mg^{2+} dépendante et la dopamine β hydroxylase. Une stimulation cholinergique, engendre une augmentation de la perméabilité de la membrane de la cellule cible aux ions Na^{+} et Ca^{2+}, ce qui induit une dépolarisation membranaire et par la suite la sécrétion. Cette dernière se fait par exocytose, tout le contenu du granule est déversé dans le sang.

- Catabolisme

Les CA sont inactivés par deux principales enzymes : la MAO (**M**ono-**A**mine **O**xydase) et la COMT (**C**atéchol-**O**-**M**éthyl-**T**ransférase), au niveau des organes effecteurs et surtout au niveau du foie. LA COMT, enzyme du plasma, du foie, des reins, interviendrait principalement dans l'inactivation des métabolites circulants, cependant, la MAO agirait plutôt secondairement sur les métanéphrines. Sous l'action de la COMT, des dérivés O-méthoxylés sont formés et se trouvent au niveau des urines, et peuvent être éliminés sous forme glucuroconjuguée ou sulfoconjuguée.

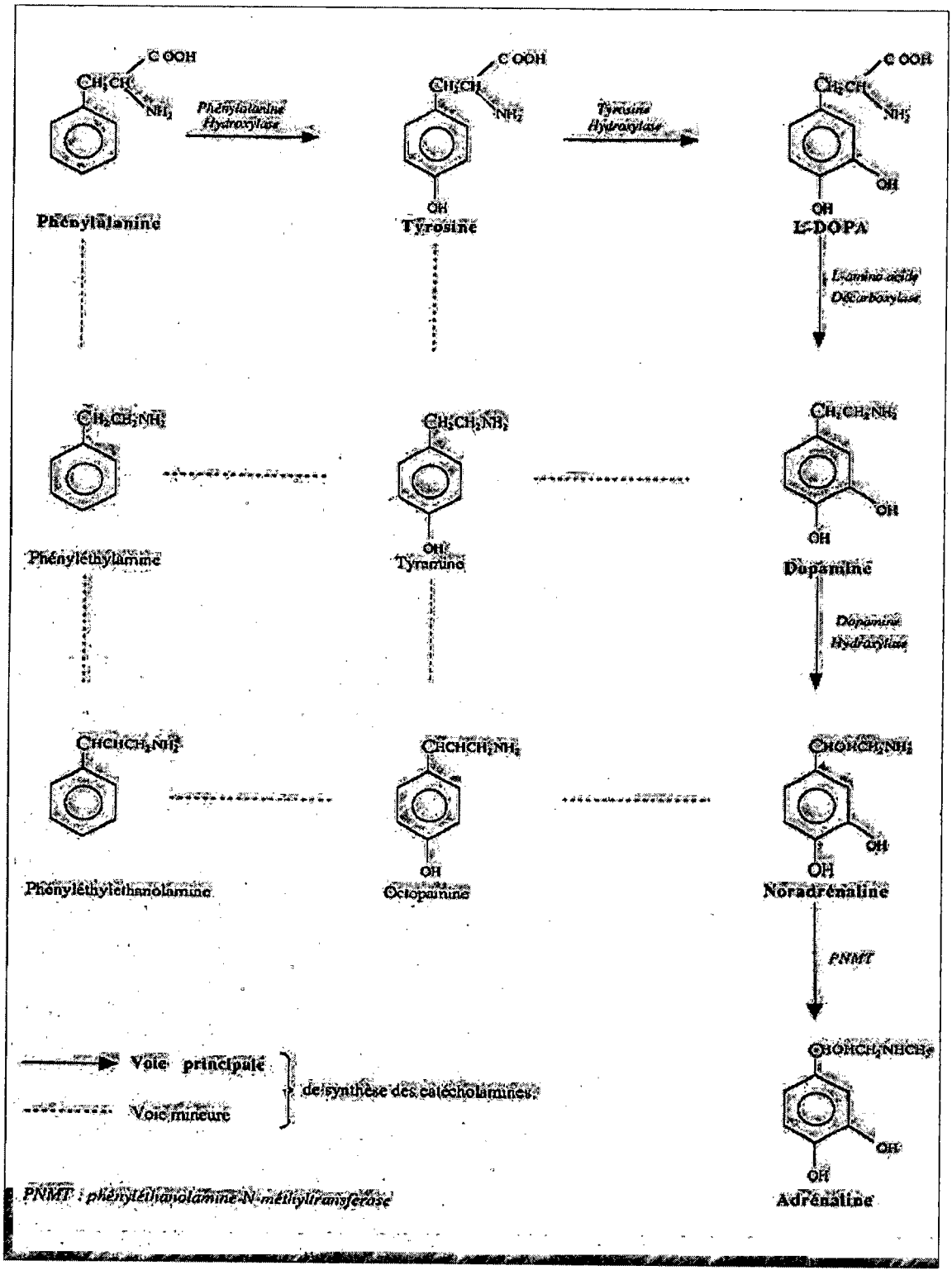


Fig. 19 Les différentes voies de biosynthèse des catécholamines

(cité dans la thèse de Moftaqir-Handaj. A, 1997)

4-2. Les effets à long terme d'un stress prénatal et postnatal sur les paramètres métaboliques et sur la régulation de l'axe HPA

Les travaux de Vallée *et al.*, 1996 ont montré que l'environnement prénatal et postnatal exercent une influence à long terme sur la réponse de l'axe HPA. Dans cette étude, les manipulations prénatales et postnatales (stress de contention) et leurs influences sur la sécrétion des glucocorticoïdes sont évaluées en mesurant les paramètres métaboliques du rat adulte : le taux du glucose plasmatique, le poids corporel et la nutrition de base. Cette même étude a montré que les modifications prénatales et postnatales ont un effet opposé sur tous les paramètres sauf, sur le taux du glucose dans le sang, qui augmente chez les animaux exposés à un stress prénatal. Selon ces auteurs, le stress prénatal provoque une altération à long terme de la régulation de l'axe HPA.

4-3. Stress, immunité et hormones dites de stress (corticostérone et catécholamines)

Hedman *et al.*, 1984 ont étudié l'effet des glucocorticoïdes sur la circulation des lymphocytes chez le rat en utilisant la technique d'immunofluorescence. Trois heures après l'injection des glucocorticoïdes, ces auteurs ont observé chez les rats non thymectomisés une réduction de 64% des cellules immunitaires affectant à la fois les lymphocytes T et B, alors que chez les animaux thymectomisés, ils ont relevé une réduction lymphocytaire beaucoup plus importante (77%). Ces travaux ont signalé que le comptage des cellules montre qu'il y 'a plus de lymphocytes T que de B qui disparaissent au niveau de la circulation. Ils ont constaté aussi que les cellules T-non auxiliaires (les lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs) disparaissaient d'une façon plus importante que les cellules T auxiliaires. L'administration de la prednisolone (glucocorticoïdes de synthèse) à ces animaux a un effet plus prononcé sur la diminution du taux des lymphocytes B que sur celui des lymphocytes T périphériques. Il parait que le taux endogène des glucocorticoïdes affecte seulement les lymphocytes T.

Quand la dose augmente, l'effet des glucocorticoïdes sur le taux des lymphocytes B semble être dose-dépendant. Les travaux de Spry, (1972) ont montré, par la technique de marquage radioactif, que la circulation des lymphocytes est liée aux glucocorticoïdes. Ces mêmes travaux ont montré que l'injection du CRF à des rats entraîne aussi une diminution des lymphocytes. Trois hypothèses découlent de ces travaux :

- Les glucocorticoïdes agiraient préférentiellement sur la circulation des lymphocytes T.

- Lors de l'injection de l'ACTH et de la prednisolone, il y 'aurait probablement une lyse des lymphocytes T et une inhibition de leur circulation par blocage de leur passage des organes lymphoïdes vers le sang.

- La synthèse de l'ADN et de l'ARN serait inhibée par les stéroïdes (glucocorticoïdes).

Dobbs *et al.*, (1993) ont mesuré le taux des corticostéroïdes plasmatiques sécrétés suite à l'exposition des animaux au stress (infection virale, privation alimentaire, réduction de l'espace etc...). Ils observent qu'un stress physiologique causé par une infection virale (Influenza A/PR8 virus) est suffisant pour activer l'axe HPA par la libération de l'ACTH. Ils ont constaté 48h après l'infection une augmentation significative du taux de la corticostérone plasmatique, et que chez des souris privées de nourriture et de boisson, le taux de la corticostérone plasmatique est plus élevé que chez des souris non rationnées. Selon ces mêmes auteurs, l'isolement des souris dans des cages cylindriques montre aussi une augmentation très prononcée de la corticostérone plasmatique.

L'étude de Stefanski, (2000) s'est intéressée aux effets du stress social (confrontation) sur l'immunité cellulaire chez le rat male : la perturbation de la réponse immunitaire chez les animaux stressés, est liée au changement hormonal. Après une confrontation chronique de 7j, les rats vainqueurs présentent une concentration stable de CBG (Corticoïd Binding Globulin), alors que la concentration de la corticostérone est faible. Cependant, les rats vaincus présentent une faible concentration de la CBG, alors que la concentration totale de la corticostérone n'a pas changé. Cette même étude a montré que le taux de la noradrénaline et de l'adrénaline augmente de façon importante chez les rats vaincus;

Et que le stress social engendre une granulocytose et une diminution du nombre des cellules T CD4 particulièrement chez les rats vaincus et chez les rats vainqueurs « non mordeurs ». Chez les rats vaincus, une corrélation entre la concentration de la noradrénaline et le pourcentage des granulocytes a été montrée. Ce travail a bien mis en évidence le rôle de la réponse hormonale dans les perturbations immunitaires induites par le stress social chez le rat.

5. Implication des récepteurs opioïdes dans les altérations immunitaires induites par le stress.

5-1 Endomorphines et récepteurs opioïdes

5-1-1. Structure anatomique de l'hypophyse

L'hypophyse est subdivisée en différentes parties, on distingue: Fig. 20

- **L'adénohypophyse** (développée à partir de l'épiblaste stomodéal) qui comprend trois parties:

1) le lobe antérieur (LA),

2) le lobe tubéral (LT),

3) la zone intermédiaire ou zone cystiforme qui représente chez l'adulte une zone étroite composée de quelques îlots cellulaires et de microkystes situés entre le lobe antérieur et le lobe postérieur.

- **La neurohypophyse** (d'origine neurale à partir du plancher diencéphalique) est également composée de trois parties :

1) l'éminence médiane (EM) située au niveau de l'infundibulum,

2) la tige hypophysaire (TH) ou tige infundibulaire,

3) le lobe postérieur (LP) ou lobe nerveux.

La technique de l'immunocytochimie a montré que les hormones antéhypophysaires ont leur source essentielle dans le lobe antérieur de l'hypophyse (Fig. 21); le lobe tubéral et la zone intermédiaire ne jouent qu'un rôle secondaire.

- ***Le lobe tubéral*** est constitué par des cordons cellulaires de type endocrinien, les cellules sont de type glandulaire; elles pourraient jouer un rôle endocrinien de substitution après hypophysectomie.

- ***La zone intermédiaire*** de l'animal renferme des cellules glandulaires à l'origine d'une sécrétion d'hormone mélanotrope et de peptides de la famille opio-corticotrope, ce qui n'est pas le cas chez l'homme.

- ***Le lobe antérieur,*** renferme une série de cellules spécialisées dans la sécrétion des hormones adéno-hypophysaires. Certaines de ces cellules prédominent dans les régions latérales du lobe antérieur (cellules somatotropes et cellules à prolactine) et d'autres dans la région médiane (cellules opio-corticotropes). Les cordons cellulaires (1) du lobe antérieur renferment des cellules disposées en plusieurs couches, ils sont limités par une lame basale péri-cordonale (LPB) et séparés des autres cordons par un capillaire à endothélium fenêtré (2). Entre les espaces capillaires, le tissu conjonctif correspond à l'espace péri-capillaire (3). A côté des cellules endocriniennes, il existe des cellules non glandulaires appelées cellules folliculaires (6). Ces cellules délimitent une cavité qui peut être remplie de substance colloïdale (5). Ces cellules envoient des expansions périphériques (4) vers la lame basale péri-cordonale.

Parmi les cellules glandulaires hormonogènes, on peut distinguer cinq types de cellules :
Les cellules somatotropes (S): elles ont une disposition périphérique au sein des cordons et prédominent dans les régions latérales du lobe antérieur. Elles fixent abondamment les colorants acides (cellules acidophiles).
Les cellules à prolactine (P): elles sont également acidophiles et localisées surtout dans les zones latérales du lobe antérieur.
Les cellules opio-corticotropes (OC) : elles sécrètent l'ACTH, l'hormone lipotrope (LPH), la β endorphine. Chez les rongeurs, les cellules OC sont localisées dans le lobe antérieur et dans le lobe intermédiaire. Cependant, chez l'homme ces cellules sont

dispersées uniquement dans la partie médiane du lobe antérieur de l'hypophyse. Ce sont des cellules basophiles, de grande taille, contenant des grains intensément colorables par le bleu d'aniline (cellules cyanophiles). Lorsque le taux de cortisol circulant augmente, leur cytoplasme est envahi par une substance hyaline à ultrastructure filamenteuse, on parle alors de cellules de « Crooke ».

Les cellules thyréotropes (T) : elles sont peu nombreuses par rapport aux autres catégories cellulaires. Elles se caractérisent par la présence d'expansions cytoplasmiques dont certaines rejoignent la lame basale péri-cordonale.

Les cellules gonadotropes (GN) : elles ont une taille et une forme variables , mais elles sont habituellement grandes, ovoïdes ou globuleuses, et situées à la périphérie des cordons contre la lame basale.

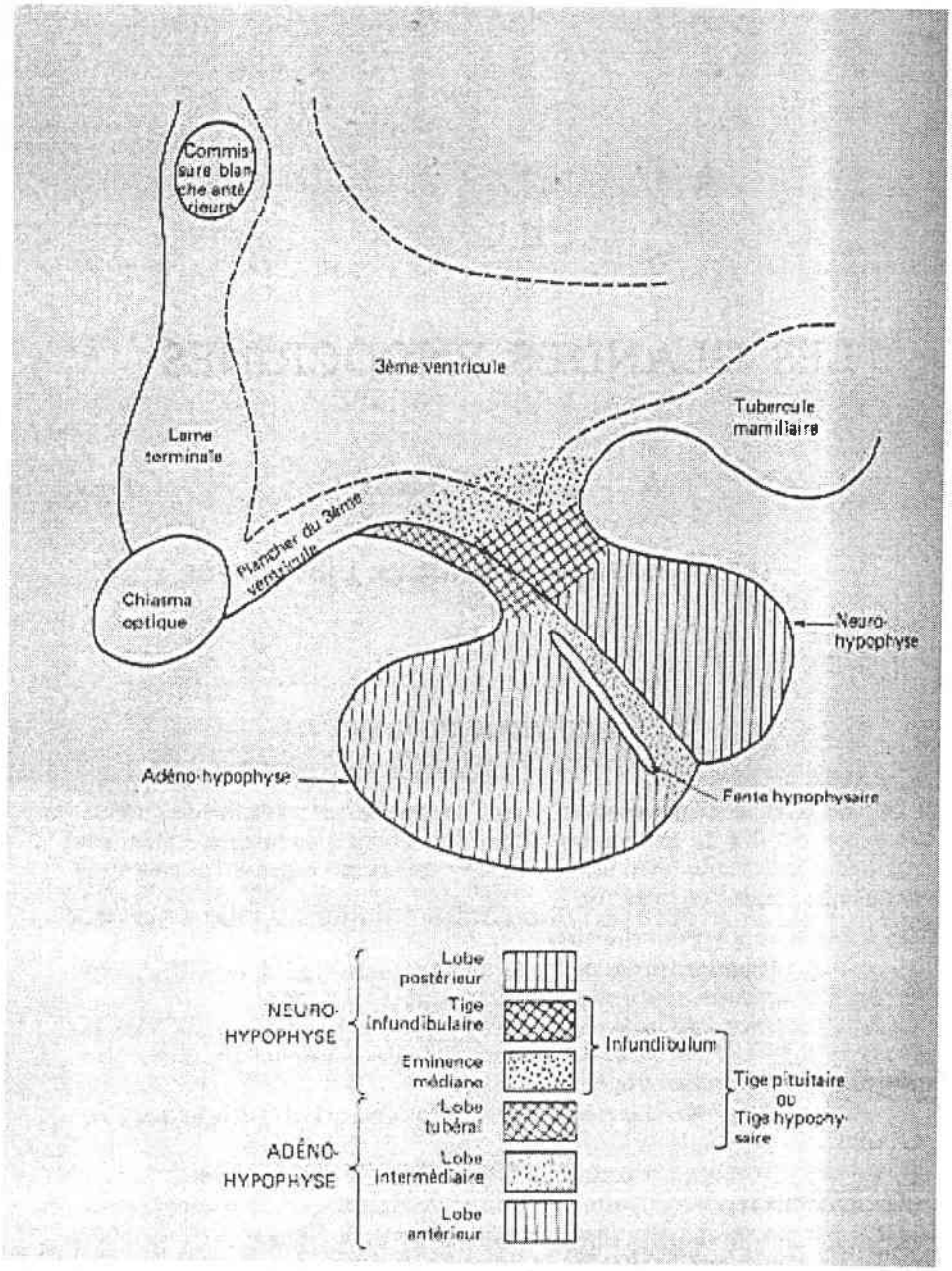


Fig. 20 Les différentes parties de l'hypophyse

(Poirier, Ribadeau-Dumas, Histologie, 1980)

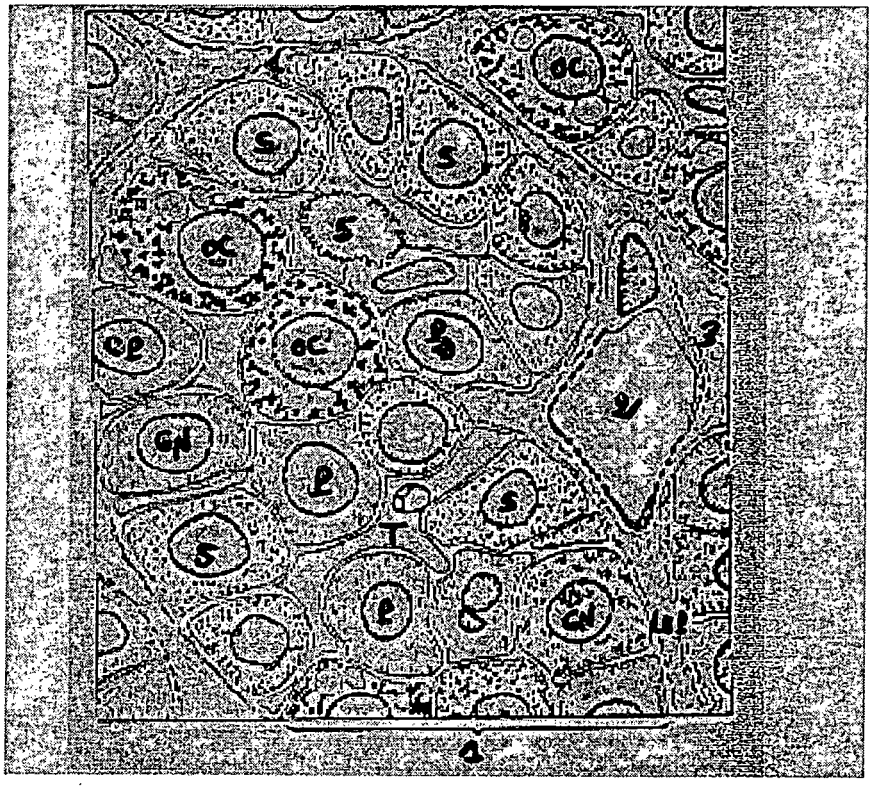


Fig. 21 Représentation schématique du lobe antérieur de l'hypophyse (Encyclopédie Médicale Chirurgicale, T1, 1998)

5-1-2. Endomorphines

- *Classification*

Les peptides opiacés ou endomorphines, sont constituées par une vingtaine de peptides qui appartiennent à trois grandes familles:

- La famille de la pro-opio-mélano-cortine (POMC), comprend les endorphines dont la β-endorphine est la mieux connue (Fig. 22)
- La famille de la pro-dynorphine donne naissance aux néo-endorphines et dynorphineA.
- La famille de la pro-enképhaline comprend en particulier la Met-enképhaline (Met et Leu-enképhaline).

- *Localisation*

Endorphines: La POMC est synthétisé dans l'antéhypophyse au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus. Les projections des neurones hypothalamiques sont nombreuses vers les régions limbiques, des noyaux du bulbe, les noyaux de la ligne médiane du thalamus et de la substance grise périacqueducale (ces deux régions sont impliquées dans l'intégration de la sensation de la douleur).
Le gène de la POMC, chez l'homme est situé sur le chromosome N°2. Dans le SNC, la POMC est synthétisée par des neurones présents dans l'hypothalamus et le tronc cérébral, le noyau arqué renferme la majorité des neurones hypothalamiques à POMC. Le gène de la POMC s'exprime dans d'autres tissus que ceux de l'adénohypophyse et du SNC, surtout que les leucocytes (les lymphocytes) peuvent sécréter de la β endorphine en cas d'inflammation.

Enképhalines et dynorphines: Les enképhalines et les dynorphines sont largement distribuées dans les neurones cérébraux, et leurs voies sont souvent parallèles. Elles sont présentes dans les cellules chromaffines de la médullosurrénale dans les mêmes grains de sécrétion que les catécholamines avec lesquelles elles peuvent être libérées.
Chez l'homme, le gène de la proenképhaline, est situé sur le chromosome N°12, c'est au niveau de la médullosurrénale de certaines espèces et le SNC qu'il est principalement exprimé. Alors que la dynorphine et les dérivés de la prodynorphine se situent chez l'homme sur le chromosome N°20, ils s'expriment principalement dans le SNC, la glande médullosurrénale et l'hypophyse antérieure.

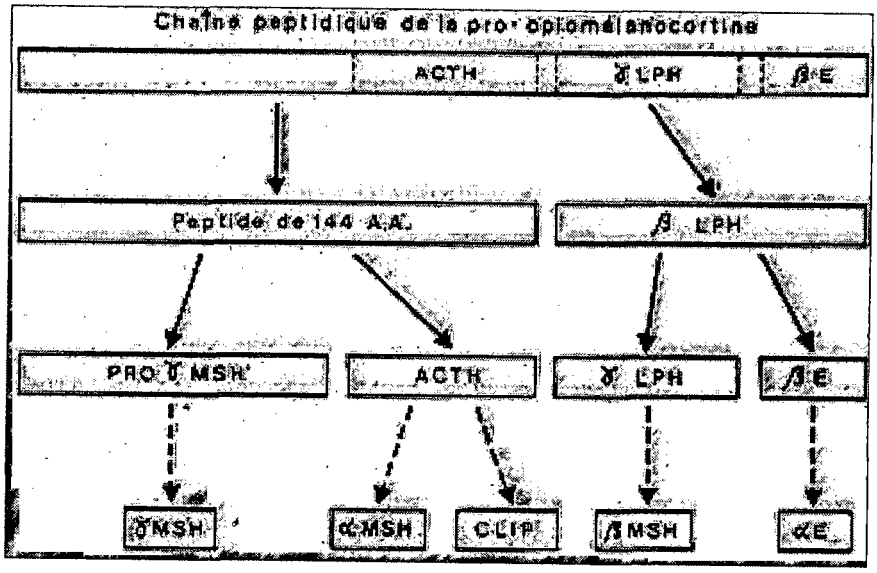


Fig. 22 Chaîne peptidique de la pro-opiomélanocortine

(Encyclopédie Médicale Chirurgicale, T1, 1998)

5-1-3. Rôle et distribution des récepteurs opioïdergiques

5-1-3-1. Opiacés et système nerveux central

Les "analgésiques narcotiques" dont le prototype est la morphine, sont des ligands exogènes pour ces récepteurs dont les peptides opiacés sont les ligands endogènes (endomorphines). Le contrôle de la douleur est donc le domaine d'intervention essentiel des peptides opiacés.

Les agonistes μ ont un effet euphorigène et sont sujets à accoutumance tandis que les agonistes k qui produisent une sensation désagréable et peuvent générer des hallucinations ont un faible potentiel d'accoutumance.

L'effet de l'activation des récepteurs étant essentiellement inhibiteur, le mécanisme d'action proposé pour l'analgésie est que, par activation des canaux potassiques ou

inhibition des canaux calciques, la durée du potentiel d'action se trouve diminuée et la quantité de transmetteur libérée aux terminaisons (par exemple la substance P dans la moelle) baisse. L'influx sensitif responsable de la douleur serait donc réduit.

Le mode de transduction, contrairement aux autres systèmes de transmission est très similaire pour les trois types : les récepteurs κ, μ et δ sont couplés négativement à l'adénylcyclase par une protéine G, mais il existe aussi un couplage ionique qui permet de différencier μ et δ d'une part (canal K^+) et d'autre part (canal Ca^{++}). En effet, la modulation du couplage avec l'adénylcyclase au cours du traitement chronique par les agonistes, joue un rôle dans le développement des phénomènes de tolérance et de dépendance.

La distribution des sites récepteurs est assez mal corrélée à celle des peptides opiacés. Ainsi, le cortex et le noyau caudé ont une haute concentration en sites de liaison mais un faible taux de peptides alors que le globus pallidus est riche en enképhalines et pauvre en sites delta. De même, la substance noire et l'hippocampe reçoivent une innervation dense du système à dynorphine. Les structures les plus riches en récepteurs opioïdergiques sont le striatum, le tronc cérébral (noyaux du raphé et du trijumeau en particulier) et la moelle au niveau de la corne postérieure et de la substance gélatineuse.

Les opioïdes interagissent avec trois types de récepteurs : μ, δ et κ et ε.

Les peptides endogènes, enképhalines, dynorphines et β endorphine, ne sont spécifiques d'aucun récepteur, mais à forte concentration les enképhalines agissent sur les récepteurs μ et δ. Les récepteurs opioïdes μ sont subdivisés en μ_1 et μ_2 (Pasternak, 1993), δ sont également subdivisés en deux sous-types : δ_1 et δ_2 (Jiang *et al.*, 1991), et le κ en trois sous types : κ_1, κ_2 et κ_3 (Cheng *et al.*, 1992).

Tableau. 2 Récepteurs des opioïdes et leurs ligands. (Meunier & Shvaloff, 1992)

Récepteur	Mu	Delta	Kappa	Epsilon
Opioïdes endogènes	β endorphine Met-enképhaline Leu-enképhaline	Enképhalines β endorphine	dynorphines	β endorphine
Agonistes de synthèse	Morphine Codéine Fentanyl Péthidine	DSTBULET DPDPE	U50488H pentazocine	////
Antagonistes	Naloxone β FNA	Naloxone Naltrindole	Naloxone Nor- BNI	Naloxone
Mécanisme Effecteur	Proteine G activation des canaux K^+		Proteine G inhibition des canaux Ca^{++}	-----
Effets	Analgésie Anxiolyse Euphorie Nausées Constipation Suppression de la toux. Dépendance.	Comme μ_1 moins marqués	Analgésie Aversion Diurèse	

5-1-3-2. Propriétés pharmacodynamiques des morphinomimétiques

Les morphinomimétiques ont des propriétés pharmacologiques, dépendantes de la dose, qui concernent notamment l'analgésie, la dépression respiratoire et les effets digestifs. Les principales différences entre eux sont situées principalement au niveau de la puissance, des durées et délais d'action.

- Actions sur le SNC

Les morphiniques peuvent agir sur le SNC soit en l'inhibant soit en le stimulant.

- Analgésie

L'analgésie des morphiniques constituant la classe des agonistes purs est intense, dépendante de la dose et se manifeste à l'égard de tous les types de douleur.

- Actions psychomotrices

Les morphiniques peuvent engendrer deux types de comportements :

* Soit un état de sédation, quand le morphinique est administré chez le patient douloureux.

* Soit un état d'agitation psychomotrice plus particulier à certains terrains : vieillards, enfants jeunes, sujets cachectiques.

- Actions hypnotiques

Les morphiniques altèrent le niveau de vigilance par une dépression sélective du SNC, mais ils ne créent pas d'hypnose même à fortes doses.

- Actions respiratoires

Les morphinomimétiques provoquent une réduction de la réponse des centres respiratoires bulbaires aux stimuli hypoxémiques et hypercapniques.

- Tolérance, dépendance physique et assuétude.

- La tolérance, dite aussi accoutumance, est définie comme la nécessité d'augmenter les doses pour obtenir les mêmes effets.
- La dépendance physique, il s'agit d'un état physiologique caractérisé par un syndrome de sevrage à l'arrêt brutal de l'administration de morphiniques.
- L'assuétude ou addiction, c'est un état de besoin ou de compulsion qui incite le sujet à répéter indéfiniment l'administration du produit afin de s'en percevoir les effets psychiques ainsi que d'éviter les effets du sevrage.

5-2. Les effets des peptides opioïdes sur la réponse immunitaire

Les travaux de Cunnick *et al.,* (1989) ont montré chez le rat que le stress sous forme de chocs électriques induit la suppression de l'activité des cellules NK spléniques et la réponse des lymphocytes T à une stimulation mitogénique à la Con-A et à la PHA. Cette étude a montré aussi que le choc électrique affecte différemment les compartiments immunologiques, par exemple, une seule session de chocs entraîne une suppression de la réponse des lymphocytes spléniques et celle des lymphocytes périphériques après une stimulation à la Con-A. Cependant, l'effet suppressif du choc électrique sur la réponse des lymphocytes spléniques diminue après 5 sessions répétitives de chocs électriques. La réponse des lymphocytes du sang à une stimulation mitogénique, reste supprimée par le choc électrique répétitif. Ceci montre bien que l'immunosuppression est dépendante du nombre de sessions de chocs appliqués et du compartiment immunitaire étudié. Ces travaux ont démontré aussi que l'administration du naltrexone mais non pas celle du Diazépam avant le stress, empêche la suppression de l'activité des cellules NK,

ceci met en évidence l'implication des récepteurs opioïdes dans l'altération de l'activité des cellules NK. D'autres travaux de Shavit *et al.*, (1984) ont montré que l'activité cytotoxique des cellules NK diminue, et la croissance des tumeurs augmente après un stress chronique sous forme de chocs électriques chez l'animal et ces effets sont mimés par la morphine et bloqués par la naloxone, ceci prouve bien aussi l'implication des récepteurs opioïdes dans l'altération de l'activité cytotoxique des cellules NK. Les travaux de Flores *et al.*, (1995) ont montré chez le rat que la morphine, exerce une activité suppressive vis à vis de la réponse immunitaire. Selon cette étude la prolifération des lymphocytes périphériques après une stimulation à la Con-A est supprimé à 70 %, 2h après l'administration de la morphine à 10 mg/kg. Les mêmes résultats ont été mis en évidence par ces auteurs en utilisant un agoniste sélectif des récepteurs μ (fentanyl) à 0.05 mg/kg. Selon cette étude, un prétraitement avec un antagoniste des récepteurs opioïdes de type μ, le naltrexone à 5mg/kg bloque complètement l'action inhibitrice de la morphine à 7mg/kg sur la réponse des lymphocytes périphériques. Ces auteurs ont montré aussi que l'administration de la morphine est accompagnée d'une diminution de 30 % du nombre absolu des lymphocytes T circulants dans le sang. La technique de la cytométrie de flux a révélé que la diminution n'est spécifique à aucune des sous populations des lymphocytes T. Cependant, la morphine n'affecte pas significativement la distribution relative des monocytes, celle des neutrophiles et celle des éosinophiles. Cette même étude a montré aussi que la lymphopénie induite par la morphine est supprimée chez les animaux surrénalectomisés. Une autre étude de Flores *et al.*, 1996 s'est plutôt intéressée au SNA et son implication dans la suppression de la prolifération des lymphocytes du sang, induite après l'administration de la morphine chez le rat. Les résultats de cette étude ont bien démontré l'implication du SNA en partie dans l'immnosuppression induite par la morphine, cependant le blocage du système sympathique ou parasympathique, n'était pas suffisant pour antagoniser les effets immunosuppressifs de la morphine. La seule explication apportée par ces travaux, à la diminution de la prolifération des lymphocytes du sang, est l'activation des neurones postganglionaires non cholinergiques et non adrénergiques, ce qui entraîne une libération de neuropetides neuroactifs tels que: VIP, Peptide Intestinal Vasoactif (sécrété au niveau des nerfs parasympathiques en même temps que l'acéthylcholine),

le neuropeptide Y (sécrété par les nerfs sympathiques), la somatostatine (co-sécrétée par les nerfs sympathiques). Les effets immunomodulateurs de ces neuropeptides ont été démontrés par des études antérieures de Payan & Goetzel, (1985), qui ont mis en évidence l'existence des sites spécifiques au niveau des cellules immunitaires, ayant une forte affinité pour la substance P, pour le VIP ainsi que pour la somatostatine. En plus, Flores *et al.*, (1996) ont montré que ces peptides entraînent une augmentation et une diminution de l'activité des lymphocytes *in vitro* à différentes concentrations, la substance P augmente la prolifération des lymphocytes T humains, stimule le chimiotactisme et la production de l'H_2O_2 par les macrophages. A des concentrations inférieures à 10^{-12}M, la somatostatine inhibe la prolifération des lymphocytes T humains *in vitro.* Cependant, Wahl *et al.*, (1988) ont rapporté que les effets «anti-prolifératifs» de la morphine se traduisent d'une part, par une diminution de la libération de l'IL-1 sécrétée par les monocytes, facteur primordial pour la prolifération lymphocytaire; d'autre part, par une libération d'un autre facteur sécrété aussi par les monocytes (TGF-β), inhibant la prolifération lymphocytaire. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Chao *et al.*, (1992) qui a montré que la morphine augmente la libération du TGF-β au niveau d'une culture cellulaire PBMC. Par ailleurs, l'étude de Mills *et al.*, (1991) a démontré qu'en présence du TGF-β, il y'a une libération du monoxyde d'azote (NO) par les macrophages suppresseurs, qui a pour rôle d'inhiber par la suite la prolifération des lymphocytes.

Les travaux de Sei *et al.,* (1991) ont montré chez la souris que l'immunosuppression induite par la morphine est due à une inhibition de la recapture du Ca^{++} intracellulaire au niveau des cellules B de la rate et cet effet n'est pas altéré par la surrénalectomie, alors qu'il est bloqué par un prétraitement par la naloxone. Ces auteurs ont montré aussi que la morphine induit une diminution de la recapture du Ca^{++} au niveau des lymphocytes T CD4 spléniques. Cependant, l'effet de la morphine n'est pas bloqué par le naltrexone sur ce type de lymphocytes et il est dépendant de l'axe surrénalien, ceci montre bien que la morphine affecte la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ spléniques par le biais de voies surrénaliennes.

D'autres travaux de Fecho *et al.*, (1993) ont montré chez le rat, qu'un prétraitement avec des antagonistes β adrénergiques, bloque complètement les effets suppressifs de la morphine sur la prolifération des leucocytes spléniques stimulés à la Con-A, à la PHA et au LPS. Les résultats de cette étude ont démontré que les récepteurs β adrénergiques sont impliqués dans certains effets immunosuppressifs engendrées par la morphine. L'étude de Carr & France, (1993) a montré que le traitement par la morphine provoque une diminution de 10 à 12 % de la circulation des cellules T auxiliaires accompagnée d'une augmentation de 20 à 22 % des cellules cytotoxiques/suppressives CD8 chez le singe. Cette étude a montré aussi que la prolifération des thymocytes, des cellules T dans le sang périphérique et dans la rate sont affectées de façon importante par un traitement chronique par la morphine. Kavelaars *et al*, (1990) ont montré que les peptides opioïdes surtout la β endorphine, exercent un effet sur les cellules mononucléaires du sang humain en changeant le taux intracellulaire de l'AMP_c. Mais cet effet de la β endorphine n'est pas uniforme (des augmentations et des diminutions de l'AMP_c ont été observées). La β endorphine tend à diminuer le niveau de l'AMP_c quand la concentration de base de cette dernière est trop élevée et elle augmente quand sa concentration est trop faible. L'effet de la β endorphine sur le taux de l'AMP_c est corrélée négativement au changement du taux intracellulaire de l'AMP_c induit par une activation des récepteurs β adrénergiques.

Fuchs & Pruett, (1993) ont mis en évidence les effets suppressifs de la morphine sur les thymocytes murines *in vivo*. Cette étude a montré que la morphine induit une réduction de 30 % du poids et de la cellularité du thymus par rapport aux animaux non traités et les animaux qui ont un implant de la morphine, présentent un pourcentage important de DNA fragmentés. Le maximum de fragmentation de DNA est observé 12 heures après l'application de l'implant de la morphine. Cependant, ils ont montré que l'apoptose des thymocytes engendrée par la morphine *in vivo* est complètement bloquée par l'administration des antagonistes opioïdes et glucocorticoïdes. Ces auteurs ont bien mis en évidence l'implication des récepteurs opioïdes et glucocorticoïdes dans l'apoptose des thymocytes engendrée par la morphine *in vivo*. D'autres travaux de Lysle *et al.*, (1993) ont mis en évidence les effets immunosuppressifs de la morphine sur trois différents compartiments immunitaires: la rate, le sang et les ganglions lymphatiques

mésentériques. Ces auteurs ont montré aussi que la morphine induit la suppression dose dépendante de la prolifération des lymphocytes spléniques, la cytotoxicité des cellules NK, la production de l'IL-2 et la production de l'interféron. Ces mêmes auteurs ont démontré aussi une suppression dose dépendante de la prolifération des lymphocytes du sang périphérique. Cependant, la prolifération des lymphocytes des ganglions lymphatiques mésentériques ainsi que la production des cytokines par ces cellules n'ont pas été affecté par la morphine. Cette étude a montré aussi que les effets immunosuppressifs de la morphine sur ces différents compartiments immunitaires sont antagonisés par le naltrexone.

Les travaux de Molina *et al.*, (1995) suggèrent que les opiacés endogènes (morphine et codéine) sont sécrétés au niveau des tissus des rongeurs en particulier au niveau du cerveau, de la rate et des poumons. Cette étude a montré que la concentration de la morphine splénique (3 fois) et cérébrale (5 fois) plus élevée, 24h après le stress (privation de la nourriture). Selon ces mêmes auteurs, la concentration de la codéine cérébrale et splénique ne varie pas chez les animaux stressés. Ces résultats suggèrent que la morphine cérébrale, est impliquée dans les effets métaboliques et comportementaux liés au stress alimentaire, alors que les effets des opiacés dans la rate sont surtout liés à l'immunomodulation, dépendante des facteurs nutritifs.

D'autres travaux de Marotti *et al*, (1996) ont montré que le stress de contention, diminue la prolifération des lymphocytes après une stimulation à la Con-A, les PFC formées (SRBC) et l'activité des cellules NK spléniques chez la souris. Par contre, l'activité de phagocytose a plutôt augmenté. Ces auteurs ont montré aussi que l'administration de 10 mg/kg, i.p. de la Met-enképhaline (MENK), 30 min avant le stress, atténue les perturbations engendrées par le stress (sauf pour l'activité des cellules NK) et atténue aussi l'augmentation des glucocorticoïdes induite par le stress. Cependant la MENK, affecte de façon similaire la réponse immunitaire des animaux non stressés en diminuant l'activité des cellules NK et la réponse de PFC et en augmentant l'activité phagocytaire. Contrairement au stress, MENK n'a aucun effet sur la prolifération lymphocytaire. Cette étude a montré aussi qu'un prétraitement par la naloxone, inverse les effets du stress tels que l'augmentation de la phagocytose et la diminution de la prolifération cellulaire.

Selon cette même étude, les altérations de la réponse immunitaire induites par le stress sont probablement provoquées par deux mécanismes: l'activation de l'HPA et la sécrétion des peptides opioïdes : les lymphocytes T et B sont apparemment affectés par l'activation de l'axe HPA, les cellules de phagocytose sont directement affectés par les opiacés, alors que les cellules NK sont sous le contrôle d'autres facteurs.

Les travaux de Roy & Loh, (1996) ont montré que les opioïdes affectent la prolifération des macrophages (immunité naturelle), celle des lymphocytes (immunité adaptative) ainsi que la différenciation des cellules immunitaires. Selon cette étude, les opioïdes agissent sur le système immunitaire via deux voies :

- Une voie centrale: activation de l'axe HPA en produisant des corticostéroïdes immunosuppressifs ou en stimulant le système nerveux sympathique en libérant les catécholamines.
- Une seconde voie directe: c'est la fixation des opiacés directement sur les récepteurs présents au niveau des cellules immunitaires en induisant l'immunosuppression.

D'autres travaux de Chang *et al.*, (1998) ont mis en évidence l'interaction entre l'IL-1 et le traitement chronique à la morphine. Ces travaux montrent d'une part, que le traitement chronique à la morphine atténue la production de l'IL-1 et par conséquent, diminue la sécrétion des glucocorticoïdes par le biais de l'axe HPA. Selon cette étude, la réduction de la sécrétion des glucocorticoïdes contribue à renforcer la réponse des leucocytes: LEA (Leucocyte Endothelial Adhesion) dans les veinules mésentériques du rat. D'autres part, la sécrétion de l'IL-1 induit l'expression des récepteurs opioïdes sur les cellules endothéliales après l'exposition au stress.

Jonsdottir *et al.*, (2000) ont montré que l'administration i.c.v de la β endorphine entraîne *in vivo* une augmentation dose dépendante de la cytotoxicité de l'immunité naturelle, de façon similaire que le stress physique volontaire chronique (5 semaines d'exercice physique). Selon cette même étude, une administration centrale de LENK ou MENK et de la dynorphine n'affectent pas *in vivo* la cytotoxicité de l'immunité naturelle. Ces auteurs ont mis en évidence l'implication centrale des récepteurs opioïdes de type δ dans l'augmentation de la cytotoxicité des cellules NK *in vivo*.

D'autres travaux de Wichmann *et al.*, (2000) ont montré chez la souris que l'administration de la naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes) après un choc hémorragique induit d'une part, une diminution des fonctions des macrophages péritonéales et spléniques du système immunitaire; d'autre part, la naloxone réduit aussi de façon similaire que le choc hémorragique la production des interleukines: IL-1, 2, 3 et 6 sécrétés par les macrophages spléniques et péritonéales comparé aux animaux ayant subi un choc hémorragique et traités au NaCl 0.9 %. Cette étude a montré aussi que le choc hémorragique augmente le taux plasmatique de la corticostérone, alors que l'administration de la naloxone ne fait pas varier la concentration plasmatique de cette hormone. Cette étude a suggéré que le système opioïdergique est primordial pour le maintien de l'équilibre du système immunitaire dans le cas du stress sous forme de choc hémorragique.

5-3. Les effets directs de la morphine sur la réponse lymphocytaire

Les travaux de Chuang *et al.*, (1995) ont montré que la morphine induit une diminution de l'activité phagocytaire et chimiotactique des cellules polymorphonucléaires des primates. Cette étude a isolé et identifié l'ARN messager codant pour le gène des récepteurs μ au niveau des cellules immunitaires humaines et celles du singe. Les récepteurs opioïdes sont exprimés au niveau du : CEMX174 (hybride des cellules B et T humaines); cellules B humaines, Cellules CD4+ humaines, monocytes et macrophages humains, PMN humain, cellules mononucléaires du sang périphérique chez le singe et PMN du singe. D'autres travaux de Mehrishi & Mills, (1983) ont mis en évidence chez l'homme l'existence des récepteurs opioïdes de type μ sur les lymphocytes du sang périphérique. Les travaux de Madden *et al.*, (1987) ont montré que les lymphocytes T humains présentent une faible affinité pour la naloxone, qui est partiellement déplacée par la morphine, par la β endorphine et par les agonistes des récepteurs opioïdes de type sigma. Ovadia *et al.*, (1989) ont mis en évidence chez le rat l'existence des sites pour la naloxone au niveau des splénocytes. Cette dernière étude a montré que la fixation de la naloxone est sensible aux ions Na^+ et au guanosine 5'o-3-thiotriphosphate (GTPγ s), en suggérant que

la protéine GTP qui a pour fonction de se coupler au récepteur de l'adénylate cyclase est impliqué dans la fixation des opiacés au niveau des lymphocytes. Cependant, les travaux de Radulescu *et al.*, (1991) ont montré que les lymphocytes T murins présentent aussi des récepteurs opioïdes de type μ qui sont plutôt couplés au canal Ca^{++} dans le tissu nerveux. Ces auteurs ont mis en évidence aussi l'existence des sites sigma et kappa au niveau des lymphocytes murins.

6. Implication des récepteurs benzodiazépiniques dans les perturbations immunitaires induites par le stress

6-1. Pharmacologie des récepteurs benzodiazépiniques

Deux types majeurs de récepteurs benzodiazépiniques ont été identifiés : centraux et périphériques.

6-1-1. *Récepteurs benzodiazépiniques centraux*

Ce type de récepteur est lié au complexe-récepteur GABA-A, et il est responsable des actions cliniques connues des benzodiazépines tels que : les actions anxiolytiques, hypnotiques, anticonvulsivantes et myorelaxantes (Braestrup & Squires, 1977)

6-1-1-1. Récepteur Gaba-A

Les benzodiazépines agissent sur des récepteurs hautement spécifiques du SNC, on les identifie grâce à leur haute affinité pour les ligands radioactifs benzodiazépiniques et ils sont visualisés sur coupes histologiques par autoradiographie ou dans le cerveau intact par tomographie par émission de positrons. Les récepteurs aux benzodiazépines est un complexe supra-moléculaire formé de glycoprotéines contenant les sites de liaison pour les ligands des récepteurs Gabaergiques type-A. Les molécules dites benzodiazépines sont des dérivés de la benzodiazépine-1,4 ou 1,5. Leurs propriétés pharmacologiques principales sont dues à des effets sédatifs, hypnotiques, anticonvulsivants :

- Les benzodiazépines se fixent sur des sites spécifiques dits récepteurs aux BZD.
- Ces sites sont liés aux sites GABA-A mais distincts d'eux et les BZD ne sont pas des agonistes GABA-A mais des agonistes pour des sites propres aux BZD.
- Les BZD sont inactives en l'absence de gaba, elles potentialisent la réponse du gaba sur les sites du GABA-A par effet allostérique. L'étude pharmacologique des sites BZD a

conduit non seulement aux agonistes, les BZD elles mêmes, mais aussi aux antagonistes, aux agonistes inverses du groupe des bêta-carbolines.

6-1-1-2. Structure du récepteur (Fig. 23)

C'est un récepteur de type ionotrope constitué de 5 sous-unités dont la disposition trans-membranaire laisse la place à un canal pour les ions chlorures. Quatre sous unités différentes (α, β, δ, σ) ont été identifiées et leur gènes ont été clonés. Une hétérogénéité, due à un agencement des sous-unités de diverses manières conduit à des sous types récepteurs différant par leur localisations et leur propriétés de liaison avec les BZD. Des ligands spécifiques ont été synthétisés pour les deux sous types principaux, BZD-1 (localisation préférentielle dans le cervelet) et BZD-2 (localisation préférentielle dans l'hippocampe et le cortex).

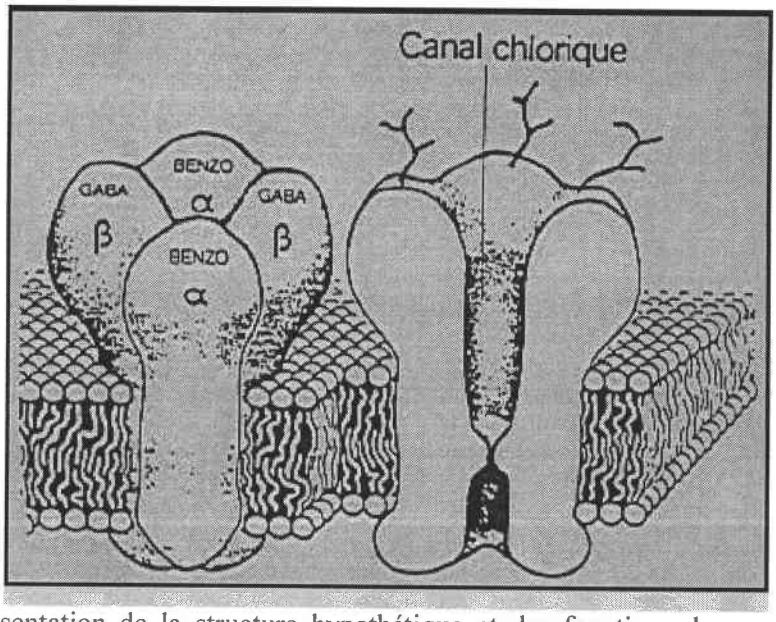


Fig. 23 Représentation de la structure hypothétique et des fonctions du complexe récepteur au GABA-A/récepteur benzodiazépinique/canal chlorique. Les sous unités β contiennent un site de fixation pour le GABA et des sites de fixation pour les barbituriques et certains convulsivants.

Les sous unités α contiennent le récepteur benzodiazépinique.

(Cité dans la thèse de A. Denis, Les modèles animaux de l'anxiété anxiolytiques : perspectives thérapeutiques, 1997)

6-1-1-3. Propriétés du récepteur

L'activité du récepteur Gaba-A se manifeste par un courant d'ions chlorés hyperpolarisant.

- L'amplitude de la réponse du GABA-A diminue en présence du GABA dans le milieu.
- La fréquence d'ouverture et de fermeture des canaux est modulée par des ligands endogènes ou exogènes :

- *Antagonistes* qui bloquent le site et empêchent la fixation d'autres BZD, ils sont sans effet propre sur l'impact du GABA sur son récepteur, ce sont des ligands neutres (le flumazénil).

- *Agonistes inverses* qui diminuent la perméabilité au chlore et donc l'efficacité du GABA. Ils sont donc anxiogènes.

- *Agonistes* qui augmentent la perméabilité au chlore et donc l'efficacité du GABA. Ils sont donc anxiolytiques.

- *Agonistes partiels* qui potentialisent l'effet du GABA plus faiblement que les agonistes complets.

A ce jour 3 BZD endogènes ont été partiellement purifiées dans le cerveau humain.

Il s'agit du DBI (Diazepam binding inhibitor), des β carbolines et des endozépines. Les deux premières molécules sont des agonistes inverses du site BZD du récepteur GABA-A, alors que les endozépines sont des agonistes.

Dans les pathologies anxieuses, il est possible que l'équilibre endogène entre BZD agoniste et agonistes inverses soit perturbé, avec une prédominance pour les agonistes inverses. Ce qui conduirait une hyperactivité quasi générale des systèmes à neurotransmetteurs excitateurs.

6-1-2. *Les récepteurs benzodiazépiniques périphériques*

C'est une protéine de 18 KDa, elle est exprimée sur la membrane mitochondriale (McEnery *et al.*, 1992). D'après DeSouza *et al.*, (1985), les récepteurs benzodiazépiniques périphériques sont essentiellement abondants au niveau des organes endocriniens : le cortex surrénalien, l'hypothalamus postérieur, le tissu interstitiel des testicules, la prostate, l'ovaire, l'utérus, le placenta et l'hypophyse, ainsi qu' au niveau de la peau, des poumons, de la rate, du cœur et de la moelle osseuse. Selon cette même étude, ce type de récepteur existe aussi au niveau des cellules gliales du SNC.

Les travaux d'Anholt *et al.*, (1985) ont démontré aussi l'existence des récepteurs benzodiazépiniques périphériques au niveau de la moelle osseuse, thymus (surtout le medulla), la rate (la pulpe blanche expriment deux fois plus de récepteurs benzodiazépiniques que la pulpe rouge), les ganglions lymphatiques et les plaques de Peyer (Benavides *et al.*, 1989).

6-2. Les sites des benzodiazépines au niveau des cellules immunitaires

6-2-1. *Etudes réalisées chez les rongeurs*

Les récepteurs benzodiazépiniques périphériques ont été identifiés au niveau des thymocytes murins (Wang *et al.*, 1981), des mastocytes chez le rat (Miller *et al.*, 1988). Selon l'étude de Zavala *et al.*, (1984), les splénocytes murins sont riches en récepteurs benzodiazépiniques surtout au niveau de la population des macrophages et au niveau des cellules T, ces dernières présentent une capacité de fixation 5 fois plus faible que celle des macrophages. D'autres travaux de Yamagishi *et al.*, (1998) ont montré chez le rat, que les glandes parotides et sub-mandibulaires présentent des récepteurs BZD périphériques et centraux au niveau de la membrane cellulaire.

6-2-2. *Etudes réalisées chez l'Homme*

Il a été démontré par Ruff *et al.*, (1985) que les récepteurs benzodiazépiniques périphériques existaient au niveau des monocytes. Alors que Bond *et al.*, (1985) ont mis en évidence l'existence des sites aux benzodiazépines, plutôt au niveau d'une préparation de membranes des cellules polymorphonuclèaires. Rocca *et al.*, (1993) ont montré l'existence de ces récepteurs au niveau des granulocytes, des monocytes, des lymphocytes T CD4, TCD8, et au niveau des lymphocytes NK et B. Selon cette même étude, l'ordre d'abondance de l'expression de ce type de récepteurs est le suivant:
la teneur de ces récepteurs est la même au niveau des monocytes et des neutrophiles, elle est plus importante que celle retrouvée au niveau des lymphocytes B, TCD4 et des T CD8, qui a son tour plus importante que celle retrouvée sur les plaquettes et les érythrocytes. Les travaux de Bessler *et al.*, (1997) et Covelli *et al.*, (1998) ont montré l'existence des récepteurs BZD périphériques au niveau des macrophages et d'autres cellules immunitaires humaines.

6-3. Stress, immunité et benzodiazépines

L'étude de Bessler *et al.*, (1992) a démontré chez l'homme que la fonction des lymphocytes T n'est pas altérée après l'administration du clonazépam (agoniste sélectif central des récepteurs BZD). Cependant, l'administration des agonistes périphériques et mixtes à fortes doses, réduisent la prolifération des PBMC humains (à la Con-A et à la PHA) et l'activité de l'IL-2 et l'IL-3. Cette étude a montré aussi chez la souris que le traitement par des agonistes périphériques et mixtes à faibles doses, entraîne des effets antiprolifératifs des cellules malignes du thymus et des thymocytes normaux (Wang *et al.*, 1984). Les travaux de Ramseier *et al.*, (1993) ont montré que les agonistes périphériques (PK11195 et RO5-4864), mixtes (diazépam) et centraux (clonazépam) des récepteurs BZD, entraînent une inhibition de la prolifération des cellules T et B *in vitro*, une réduction de la stimulation allogénique des lymphocytes T dans une culture de lymphocytes totaux, ainsi qu'une inhibition de l'expression du récepteur à l'IL-2 et la production de l'IL-2. Cependant, seulement quelques études, se sont intéressées à examiner les effets du traitement aux BZD *in vivo* (Schlumpf *et al.*, 1993) ont mis en

évidence une immunosuppression chez le rat suite à un traitement prénatal aux BZD, ceci est du à l'implication des récepteurs BZD périphériques, qui régulent négativement les macrophages spléniques. Ceci a été confirmé par l'étude de Morgulis *et al.*, (1999), qui a montré chez le poussin que les récepteurs BZD jouent un rôle important dans l'activité des macrophages et dans l'activité de toute catégorie cellulaire intervenant dans la résistance et la défense contre les infections.

D'autres travaux de Galdiero *et al.*, (1995) ont montré qu'un traitement chronique aux BZD (plus de 2 à 3 mois), entraîne une diminution des réponses spécifiques et non spécifiques chez la souris. Les animaux traités pendant 3 mois avec du diazépam ou du chlordemethyldiazépam survivent moins aux infections du type *Salmonella typhimurium.* Ces auteurs ont montré aussi que l'adhésion des PMN diminue après un traitement de 7j aux BZD et un long traitement aux BZD atténue d'avantage cette réduction d'adhésion. Selon cette même étude, les PMN traités aux BZD pendant 90 j montrent aussi une diminution de chimiotactisme et de phagocytose des germes tels que *Saccharomyces cerevisiae.* Ces auteurs ont montré aussi que les monocytes des animaux traités aux BZD pendant 7j, sécrètent plus d' IL-1α que les animaux non traités. Cependant, le titre d'anticorps des animaux traités à long terme aux benzodiazépines, est faible comparé à celui des animaux non traitées. Cette étude a montré aussi qu'un traitement à court terme aux benzodiazépines, entraîne une augmentation de l'incorporation de la thymidine-H^3 par les lymphocytes activés (Con-A ou LPS), alors qu'un traitement à long terme, diminue au contraire cette incorporation de la thymidine-H^3 par les lymphocytes stimulés par la Con-A ou par du LPS.

L'étude de Freire-Garabal *et al.*, (1991) a montré chez la souris que les BZD à profil anxiolytique inverse partiellement les effets suppressifs du stress chirurgical vis à vis de la réponse des cellules T de la rate et celle du foie contre les microorganismes pathogènes tels que : *Listeria monocytogenes.* D'autres travaux de Freire-Garabal *et al.*, (1993) ont montré que le stress de bruit (5s/min pendant 1h ou 3h) chez des souris infectées à *Influenza* PR-8/34, renforce les effets suppressifs de l'infection sur l'activité des cellules NK, sur la réponse de l'hypersensibilité retardée et sur la production de l'Il-2. Ces mêmes auteurs ont montré que le temps de survie après l'infection au PR-8/34 est plus court et que le titre du virus est plus élevé dans les poumons des animaux

stressées infectés. Cependant, un prétraitement à l'alprazolam induit une réduction du titre du virus et par conséquent une augmentation du temps de survie chez les animaux stressés.

6-4. Stress, anxiété, expression des récepteurs BZD

Nudmamud *et al.*, (2000) se sont intéressés à étudier l'anxiété chez des étudiants universitaires pendant la période des examens. Ces auteurs ont montré que le taux de l'ARNm destiné pour la synthèse des récepteurs BZD périphériques (indicateur de l'anxiété), est faible chez les sujets anxieux. Cependant, la période anxiogène des examens provoque, une diminution du taux de l'$ARNm_{BZD}$ chez les uns et, plutôt une augmentation chez les autres. Dans la même cohorte, le taux du cortisol augmente et celui de la prolactine diminue. Cette étude n'a pas montré de corrélation entre les changements individuels, les taux hormonaux et le taux de l'ARNm des récepteurs benzodiazépiniques périphériques. Ce travail a suggéré que ces paramètres sont affectés différemment par des facteurs environnementaux et physiologiques.

L'étude de Miller *et al.*, (1986) a montré que le stress social (défaite sociale) augmente l'expression des récepteurs benzodiazépiniques centraux *in vivo*. Ces auteurs ont constaté une augmentation du nombre des récepteurs BZD, 20 min après l'exposition au stress, au niveau du cortex cérébral, de l'hypothalamus et du cerebellum. Les résultats de cette étude ont montré aussi que l'augmentation de l'expression des récepteurs BZD, est bloquée par la surrénalectomie, et elle est restaurée à la suite de l'administration de la corticostérone. D'autres travaux ont montré que le stress aigu tels que, la nage froide (Novas *et al.*, 1987), les chocs électriques (Drugan *et al.*, 1988), le bruit (Ferrarese *et al.*, 1991), augmente la densité des récepteurs BZD. Cependant le stress répétitif, la nage forcée (Burgin *et al.*, 1996), les chocs électriques répétés (Drugan *et al.*, 1988), entraînent plutôt une réduction de la densité des sites aux BZD.

TRAVAUX PERSONNELS

Etudes fondamentales

PARTIE. I

Validation d'un modèle de stress physique : évaluation de l'intervalle optimal séparant l'immunisation et le stress, effets du stress sur les réponses comportementales, gastriques et immunitaires.

A. But du travail

L'objectif principal de cette première partie de notre travail est de préciser expérimentalement, les effets du stress expérimental sur les réponses comportementales, gastriques et immunitaires chez la souris, en évaluant l'intervalle optimal qui sépare l'immunisation et le moment de l'application du stress. Cet objectif se propose de valider d'abord le modèle en comparant les animaux non immunisés non stressés aux immunisés non stressés et d'autres animaux immunisés et stressés, à trois durées différentes 1j, 3j et 5j.

B. Matériels et méthodes

1- Animaux

1-1. L'espèce utilisée

Les animaux utilisés dans le cadre de cette étude sont des souris mâles hétérozygotes âgées de 12 semaines, issues de la lignée SWISS et provenant des centres d'élevages R. JANVIER, France.

1-2. Conditions d'élevage

Les souris sont réparties au hasard par groupe de 5 dans des cages standards en macrolon (22 x 16 x 14 cm). L'eau et la nourriture [croquettes complètes et vitamines M_{25} Extra Labo., provins] sont fournies à volonté. Les animaux sont placés quinze jours avant le test dans une pièce expérimentale soumise à un cycle jour/nuit de 12 heures d'éclairement et 12 heures d'obscurité, la lumière s'allumant à 1 heure du matin pour s'éteindre à 13 heures. L'étude comportementale se fait entre 13h et 17h. Les expérimentations sont réalisées durant la phase nocturne et correspond à la phase active du cycle nycthéméral des animaux.

2. Immunisation

Pour se transformer en lymphoblastes, les lymphocytes sont stimulés soit par des antigènes ou par des mitogènes.

2-1. Action des antigènes

Dans cette action, la stimulation antigénique est dite « spécifique » parce que les lymphocytes mis en présence d'un antigène ne se transformeront en lymphoblastes que s'ils le reconnaissent : cela implique un contact lymphocyte-antigène.

2-2. Action des mitogènes

Dans un autre type d'action, la stimulation antigénique est dite au contraire « aspécifique » et elle atteint une plus grande population de cellules. De nombreuses substances possèdent cette propriété :

- La Phytohémagglutinine (PHA) : lectine végétale extraite de *Phaseolus vulgaris* , utilisée comme stimulant des lymphocytes T .

- La concanavaline-A (Con-A) : protéine extraite de *canavalia ensiformis* qui stimule également les lymphocytes T.

- Le pokeweed mitogène : glycoprotèine de *phytolacca americana* qui stimule les lymphocytes T et les lymphocytes B.

D'autres substances tels que les LPS (lipopolysaccharides de salmonella) ont la propriété de stimuler la réponse des lymphocytes B, alors que les SRBC (Sheep Red Blood Cells: les globules rouges de mouton) sont plutôt utilisés dans le but de stimuler à la fois la réponse des lymphocytes T et B.

Dans notre protocole, les animaux sont immunisés par des SRBC (Laboratoires BioMérieux), ils sont administrés par voie i.p. pendant la phase obscure (Laudenslager *et al.*, 1988). On administre aux souris 10^6 cellules SRBC dans un volume approximatif de 150 µl du NaCl 0.9 % (Zalcman *et al.*, 1988)

3. Procédure du stress physique (chocs électriques)

On met les souris par lot de 5 dans la boite de vogel. Il s'agit d'une enceinte en plexiglas opaque (27.5 x 24 x 28.5) reliée à un générateur qui l'alimente en courant électrique. La grille à l'intérieur de l'enceinte joue le rôle de conducteur électrique. Les chocs électriques sont appliqués 1j, 3j et 5j après l'immunisation. Ils se caractérisent par les trois critères suivants : inévitables, répétitifs et douloureux.

- *Inévitables* : l'animal ne dispose d'aucune possibilité pour éviter le choc électrique, c'est une composante objective.

- *Répétitifs*: pour que l'application du stress expérimental ne soit pas limitée dans le temps et qu'elle soit du type chronique, c'est une composante objective.

- *douloureux* : Il faut que la stimulation (douleur) soit gênante pour l'animal et crée une réaction de stress, c'est la seule composante subjective.

Les paramètres retenus et utilisés pour les chocs électriques ont été inspiré de la technique de **Zalcman *et al.*, (1988).**

Tableau 3. Les différents paramètres retenus pour la procédure du stress physique (selon Zalcman *et al.*, 1988)

Intensité du choc électrique (en μA)	150 μA.
Nombre des chocs électriques	300.
Durée du choc électrique (en secondes)	2 sec.
Durée séparant les chocs électriques (en secondes)	9 sec.
Durée totale de la procédure du stress pour chaque animal (en minutes)	50 min

4. Etudes immunologiques

Vingt quatre heures après l'application du stress, les animaux sont anesthésiés, par injection intrapéritonéale du pentobarbital sodique (Sanofi, France) à 6 % dilué au 1/10ème dans du NaCl 0.9 %. On récupère immédiatement après l'anesthésie, le sang par ponction cardiaque dans des tubes héparinés; le sang est fractionné en deux parties : 300 µl pour le comptage cellulaire (Technicon-H2 et Facscan) et 600 à 700 µl pour le dosage immunoenzymatique. Le sang récupéré est centrifugé à 2000 Tr/min pendant 10 min (Jouan, Paris), les sérums sont ensuite stockés à -20°C jusqu'au moment du dosage.

4-1. Comptage des cellules Sanguines : Numération Formule Sanguine (NFS)

4-1-1. Principe de mesure

Le comptage et la différenciation des éléments figurés du sang reposent sur le principe de diffraction d'un rayon lumineux, induit par le passage des éléments, un par un, devant la source lumineuse (Lampe tungstène halogène) provoquant une diffraction et absorption de la lumière respectivement proportionnelle à sa taille et à sa coloration. Les populations leucocytaires (lymphocytes, monocytes, éosinophiles, basophiles, neutrophiles) sont examinées selon leur taille et l'activité péroxydasique de leur cytoplasme (analyse cytochimique) complétée par l'étude de la densité chromatinienne et du degré de segmentation des noyaux par diffraction laser (analyse morphométrique).

4-1-2. Les canaux de mesure

Après aspiration de 100 µl d'échantillon, le sang est fractionné en compartiment de volume déterminé, chacun étant respectivement entraîné par un volume précis de réactif vers la cuve de mélange réactionnel. L'enregistrement des signaux est traduit au niveau du module électronique, qui transmet les résultats visualisés sur l'écran de contrôle, à

l'imprimante. Deux canaux de mesure (canal de l'activité péroxydasique et canal basophile) permettent d'analyser les populations leucocytaire :

Le canal de l'activité péroxydasique (Analyse cytochimique) qui permet d'obtenir un nuage de répartition des éléments, suivant leur valeur respective en X (activité péroxydasique) et Y (taille des cellules) et le canal des basophiles (Analyse morphométrique), permettant d'obtenir un nuage de répartition des éléments suivant leur valeur en X (densité de chromatine et de degré de segmentation des noyaux) et en Y (taille des éléments). Un seuil horizontal, fixe, permet la séparation des deux types de populations (Polylobés et les monolobés) suivant la taille des éléments.

4-2. Dosage des anticorps totaux : E.L.I.S.A

4-2-1. Principe

Au cours de ces dernières années, les méthodes immunologiques sont de plus en plus utilisées pour le dosage quantitatif précis. Ces méthodes offrent l'avantage d'allier la spécificité à la précision. Pour la titration des anticorps totaux la technique E.L.I.S.A de type sandwich a été utilisée. Elle repose sur la mise en évidence par une technique enzymatique de complexes immuns formés d'anticorps anti-souris fixés sur un support et d'anticorps éventuellement présents dans le sérum à tester. Pour ce dosage, il est nécessaire que l'antigène (anticorps de souris dans notre cas) possède plusieurs épitopes, de telle façon qu'après sa réaction avec l'anticorps immobilisé, il puisse réagir avec le deuxième anticorps spécifique couplé à l'enzyme. Après lavage les complexes immuns sont révélés par des Anticorps marqués à l'aide d'enzymes. Les complexes formés sont proportionnels au taux d'Anticorps dans le sérum.

4-2-2. Matériels et méthodologie

On procède à un « Coating », les puits des plaques sont enduits (200 µl) avec 2,5 µg/ml d'Anticorps anti-souris dans un tampon de Carbonate bicarbonate pendant une nuit d'incubation à 4°C. On lave trois fois avec du PBS (Phosphate Buffred Saline) Tween 20 à 0.05% (250 µl). On sature la plaque à l'aide de BSA 3 % (Bovine Sérum Albumine) (200 µl), cette opération dure 30 minutes à 37°C et on rince avec du PBS-Tween 20. On ajoute le sérum dilué dans du PBS-Tween (200 µl), les dilutions ont été faites par duplicat. L'incubation dure 3 heures à 37°C. On lave trois fois avec du PBS-Tween. On place pendant une heure à 37°C la solution d'anticorps conjugués à la peroxydase (1 µg/ml). On lave la plaque trois fois avec PBS-Tween. On distribue 200 µl d'OPD (O-Phenylenediamine Dihydrochloride) et de l'eau oxygénée. Cette dernière étape se fait à l'abri de la lumière. La réaction enzymatique est arrêtée, 10 min plus tard par ajout de 50 µl d'acide sulfurique 3 M. Ensuite la plaque est laissée à température ambiante pendant 10 minutes et les plaques sont lues grâce à un lecteur de type {MRX, Microplate Reader}, l'absorbance est mesurée à 450 nm (ces produits nous ont été fournis par les laboratoires Sigma, Saint louis, Etats unis).

5. Etudes stomacales

- Observation microscopique de l'estomac

Les estomacs sont prélevés sur les animaux après la prise de sang et avant d'être observés au microscope optique, chaque estomac est incisé, la paroi stomacale est rincée à la tyrode puis étalée, afin d'observer l'aspect des villosités stomacales. La solution de tyrode ayant servi au lavage et au rinçage de l'estomac est composé de :

NaCl : 8g / KCl : 0.2g / $CaCl_2$: 0.2 g / $MgCl_2$: 0.1g / $NaHCO_3$:1g / Na_2HPO_4: 0.05 g/ Glucose : 1g. Eau distillée : 1000 ml.

Le $NaHCO_3$ (10g) et le Glucose (10g) sont ajoutés, à la préparation de la tyrode lors de la manipulation.

La méthode utilisée au niveau de cette étude est basée sur la mesure de la longueur de chaque lésion gastrique par villosité. On calcule ensuite la moyenne des longueurs de ces lésions par surface d'estomac observée (en général 5 villosités correspondant à une superficie totale de 2.5 cm^2). (Yano & Harada, 1973).

6. Etudes comportementales

6-1. Recherche des effets du stress expérimental sur le comportement général de la souris placée dans les tests de la chambre claire/obscure et de l'escalier

Les deux tests choisis pour nos expériences « test de l'escalier et test de la chambre claire obscure» (Simiand *et al.*, 1984; Crawley & Goodwin, 1980) sont dits «tests contraignants» en raison du caractère contraignant qu'il comporte pour les animaux, puisque, placé dans ces tests, l'animal ne peut s'en extraire et en plus n'a aucune possibilité d'évitement. Les évaluations faites sur ces tests portent sur l'observation et la quantification de la réaction de l'animal, stressé au préalable, à la nouveauté du milieu et la présence d'autres agents anxiogènes tels que la lumière (Costal *et al.*, 1989). En effet les souris sont des animaux dont l'activité générale est optimale en phase nocturne. La présence de la lumière est perçue comme un élément anxiogène.

Ces tests ont été utilisés également pour la recherche des propriétés psycho-pharmacologiques de certaines substances. Le test de l'escalier tient compte de deux paramètres: les redressements et les marches montées (Simiand *et al.*, 1984), le test de la chambre claire/obscure (Kilfoil *et al.*, 1989) prend en considération des transitions, des redressements, de l'activité locomotrice et du temps passé par l'animal dans les deux compartiments éclairé et obscure.

Ces deux tests, offrent la possibilité d'évaluer de manière globale deux aspects comportementaux : un aspect exploratoire traduit par le nombre des transitions, celui des redressements et le temps passé par les animaux en particulier dans le compartiment éclairé du test de la chambre claire/obscure et par le nombre des redressements dans le test de l'escalier. D'autre part, un aspect locomoteur traduit par le nombre marches montées dans le test de l'escalier.

6-1-1. Matériels

- Test de la chambre claire/obscure

Le dispositif expérimental consiste en une enceinte en Plexiglas opaque composé de deux compartiments, l'un obscure (20 x 18 x 20cm) et l'autre fortement éclairé (20x18x20cm) les deux compartiments sont reliés par une petite porte permettant à l'animal de passer librement de l'un à l'autre.

- Test de l'escalier

La technique a été mise au point sur des rats par Molinengo & Canaleros, (1970) et adaptée aux souris par Simiand *et al.*, (1984). L'enceinte en Plexiglas opaque comprend à l'intérieur un escalier composé de 5 marches de 3 cm de hauteur, 7 cm de profondeur et 10 cm de largeur. L'appareil a les dimensions suivantes : 47 x 10 x 25 cm. Une lampe à incandescence blanche (60 W), placée au dessus de la marche la plus haute permet d'éclairer l'enceinte.

6-1-2. Méthodes

- Test de la chambre claire/obscure

La procédure expérimentale retenue est inspirée de la technique décrite par Crawley & Goodwin, (1980). Trente minutes, avant le test l'animal est prélevé de sa cage d'élevage pour être introduit dans l'enceinte éclairée. Son comportement est alors observé pendant 5 minutes (temps global).

Les paramètres pris en compte sont :

a. Le temps passé dans le compartiment clair, il est constitué par le cumul du temps passé par l'animal sous la lumière pendant le temps global d'observation.

b. Le nombre de transitions effectuées par l'animal (nombre de passages du compartiment obscure « préféré par l'animal » au compartiment éclairé « anxiogène par la lumière ») : ce paramètre indique le niveau d'anxiété.

c. Le nombre de redressements effectués par l'animal dans le compartiment éclairé.

- Test de l'escalier

L'animal est retiré de sa cage d'élevage et déposé en bas de l'escalier, le dos tourné par rapport aux marches. L'enceinte est éclairée à l'aide d'une lampe à incandescence blanche. On enregistre pendant 5 minutes (durée totale du test) deux paramètres comportementaux : le nombre de marches montées et le nombre de redressements.

C. Résultats

1. Détermination des effets de l'immunisation sur la réponse immunitaire des animaux non stressés

Comme le montre le Tableau. 4, les animaux immunisés ont montré une augmentation significative du nombre des lymphocytes (p= 0.0001), celui des neutrophiles ainsi que celui des monocytes (p= 0.003, p= 0.027; respectivement), cependant, le nombre des éosinophiles et des basophiles (p=0.056, p=0.06; respectivement) n'a que très peu varié. Concernant les paramètres sanguins, les résultats du Tableau. 5 montrent que le nombre des globules rouges, le volume globulaire moyen, le pourcentage de l'hématocrite et le nombre des plaquettes n'ont pas varié chez les animaux immunisés en comparaison à des animaux non immunisés.

2. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress physique vis à vis de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et humorale.

Comme le montre le Tableau. 6, le stress semble affecter de manière différente le nombre des populations leucocytaires en fonction de l'intervalle séparant l'immunisation de l'application du stress. On constate ainsi que le stress appliqué 1j après l'immunisation réduit de façon significative le nombre des lymphocytes, des neutrophiles, des monocytes et des basophiles. Cependant, le nombre des éosinophiles a plutôt augmenté chez les animaux stressés 1j après l'immunisation. Les résultats du Tableau. 7, ont montré aussi que le stress appliqué 1j après l'immunisation engendre une augmentation importante de la concentration sérique des anticorps totaux par rapport aux animaux non stressés et immunisés à l'intervalle de 1j. Cependant, on constate que l'application du stress 5j après l'immunisation, entraîne plutôt une diminution de la concentration des Anticorps totaux en comparaison à des animaux non stressés.

Tableau 4. Effet de l'immunisation sur le nombre des leucocytes chez la souris.

Nombre des cellules $10^3/\mu l$	NINS	INS
Lymphocytes Moy ± SEM p	1.950 ± 0.168 ///	3.824 ± 0.296 p=0.0001
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(3, 28)=20.781 ; p=0.0001	
Neutrophiles Moy ± SEM p	0.580 ± 0.132 ///	1.875 ± 0.407 p=0.004
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(3,28)=7.017 ; p=0.003	
Basophiles Moy ± SEM	0.292 ± 0.053 ///	0.283 ± 0.062 p=0.920
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(3, 28)=8.930 ; P=0.056.	
Monocytes Moy ± SEM p	1.124 ± 0.091 ///	2.340 ± 0.231 p=0.001
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(3, 28)=3.520 ; p=0.027	
Eosinophiles Moy ± SEM p	0.020 ± 0.022 ///	0.040 ± 0.003 p=0.050
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(3, 28)=3.404, p=0.060.	

NINS : Non immunisés non stressés ; INS : Immunisés non stressés

N=9x2 lots. $p < 0.05$ est considéré significatif.

Tableau 5. Effet de l'immunisation sur les paramètres sanguins chez la souris.

	NINS	INS
RBC $10^6/\mu l$ Moy ± SEM p	7.926 ± 0.363 ///	8.460 ± 0.191 p=0.229
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(1,8)= 1.695 ; p=0.229	
VCM fl Moy ± SEM p	49.220 ± 0.651 ///	51.200 ± 0.785 p=0.088
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(1,8)= 3.768 ; P=0.088	
HCT % Moy ± SEM p	39.100 ± 2.085 ///	43.360 ± 1.086 p=0.107
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(1, 8)=3.285 ; p= 0.107	
Plqts $10^3/\mu l$ Moy ± SEM p	514.200 ± 107.166 ///	483.500 ± 108.391 p=0.441
ANOVA à un facteur	***Effet de l'immunisation*** F(1.8)= 0.656 ; p= 0.441	

NINS : Non immunisés non stressés.
INS : Immunisés non stressés.
RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen; HCT : hématocrite ;
Plqt : les plaquettes. N=9x2 lots. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Tableau 3. Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress sur la réponse leucocytaire chez la souris.

Nombre des cellules en $10^3/\mu l$	**Lymphocytes** (Moyenne ± SEM) Probabilité au test	**Neutrophiles** (Moyenne ± SEM) Probabilité au test	**Monocytes** (Moyenne ± SEM) Probabilité au test	**Basophiles** (Moyenne ± SEM) Probabilité au test	**Eosinophiles** (Moyenne ± SEM) Probabilité au test
INS					
1j	3.820 ± 0.290	1.850 ± 0.401	2.340 ± 0.231	0.283 ± 0.062	0.040 ± 0.022
3j	2.812 ± 0.302	0.510 ± 0.061	1.140 ± 0.572	0.072 ± 0.017	0.011 ± 0.006
5j	2.695 ± 0.762	1.310 ± 0.281	1.512 ± 0.161	0.060 ± 0.081	0.051 ± 0.092
ANOVA à un facteur Effet des intervalles de l'immunisation	F(3, 28)= 20.781; p=0.0001.	F(3, 31)= 7.017; p= 0.001.	F(3, 28)= 3.520; p= 0.027.	F(3, 28)= 8.930; p= 0.0003.	F(3, 28)= 3.404; p= 0.031.
IS					
1j	1.730 ±0.210; p=0.007.	0.901 ±0.281; p= 0.019.	1.950±0.121; p= 0.002.	0.023±0.021; p= 0.001.	1.010±0.210; p= 0.001.
3j	3.121 ± 0.280; p= 0.120.	0.490 ± 0.071; p= 0.730.	1.900 ± 0.170; p= 0.020.	0.045 ± 0.080; p= 0.570.	0.006 ± 0.002; p= 0.901.
5j	2.821 ± 0.790; p= 0.610.	1.021 ± 0.101 p= 0.950	1.430 ± 0.201; p= 0.790.	0.052 ± 0.013; p= 0.801.	0.004 ± 0.002; p= 0.600.
ANOVA à deux facteurs					
-Effet du stress	F(1,45)=7.389;p=0.009.	F(1,43)=4.125; p= 0.040.	F(1,45)=0.544; p= 0.460.	F(1,38)=9.049; p= 0.0046.	F(1,37)=28.830; p= 0.0001.
-Intervalle entre l'immunisation et le stress.	F(2,45)=8.783;p=0.0006.	F(2,43)=12.543; p= 0.0001.	F(2,45)=2.709; p= 0.077.	F(2,38)=11.277; p= 0.0001.	F(2,37)=31.320; p= 0.0001.
-Interaction entre les deux facteurs.	F(2,45)=1.056;p= 0.356.	F(2,43)= 2.873; p= 0.067.	F(2,45)=8.170; p= 0.0009.	F(2, 38)=6.870; p= 0.0028.	F(2,37)=34.712; p= 0.0001.

INS : Immunisés non stressés ; IS : Immunisés stressés.
N=9x6 lots.

Tableau 7. Effet du stress sur l'immunité humorale (i.e. la concentration des anticorps totaux) chez la souris.

		Nombre d'animaux utilisés	La concentration en µg/ml des anticorps totaux (Moyenne ± SEM) Probabilité au test
NINS		6	9.330 ± 0.862
INS	1j	6	9.613 ± 0.872
	3j	6	48.004 ± 2.696
	5j	6	27.562 ± 1.402
ANOVA à un facteur Intervalle entre l'immunisation et le stress			F(3, 36)= 78.734 ; p= 0.0001.
IS	1j	6	47.066 ± 3.599; p= 0.0001.
	3j	6	40.756 ± 3.125; p= 0.053.
	5j	6	13.059 ± 0.716; p= 0.0001.
ANOVA à deux facteurs			
- Effet du stress.			F(1, 57)= 7.393; p= 0.008.
- Effet de l'immunisation.			F(2, 57)= 55.046; p= 0.0001.
- Interaction entre les deux facteurs			F(2, 57)= 66.150; p= 0.0001.

NINS: non immunisés non stressés.
INS : immunisés non stressés.
IS : immunisés stressés. $p < 0.05$ est considéré significatif.

3. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress expérimental vis à vis de la réponse gastrique.

Le Tableau.8 montre que le stress de façon générale a tendance à provoquer des lésions de la muqueuse gastrique, particulièrement quand il est appliqué 1j après l'immunisation (p=0.0001) par rapport aux animaux non stressés et immunisés à 1j d'intervalle. En effet, on constate que le nombre et la longueur des lésions de la muqueuse gastrique ont augmenté de façon importante chez les animaux stressés (Photo. 2) par rapport aux animaux non stressés (Photo. 1).

4. Détermination de l'intervalle optimal séparant l'immunisation du stress expérimental vis à vis de la réponse comportementale.

4-1. Les effets de l'immunisation sur le comportement général de l'animal dans les tests de la chambre claire/obscure et l'escalier

L'immunisation ne semble pas varier statistiquement le comportement général de la souris dans les deux tests utilisés, c'est pour cette raison qu'on a choisi conformément aux résultats du stress sur la réponse immunitaire (cellulaire et humorale) d'appliquer le stress 1j après l'immunisation pour évaluer le comportement général des animaux stressés dans les tests de la chambre claire/obscure et de l'escalier (Tableau 9).

Tableau 8. Effet du stress sur la réponse gastrique à différents intervalles de l'immunisation 1j, 3j et 5j chez la souris.

	Nombre d'animaux utilisés	*Moyenne des longueurs des lésions des muqueuses gastriques observées (cm)* (Moyenne ± SEM) Probabilité au test
NINS	6	3.027 ± 0.428
INS		
1j	6	3.502 ± 0.320; p= 0.541.
3j	6	3.120 ± 0.300; p= 0.446.
5j	6	3.741 ± 0.101; p= 0.823.
ANOVA à un facteur Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress.	F(3, 33)= 2.449; p= 0.081.	
IS		
1j	6	7.601 ± 0.250; p= 0.0001.
3j	6	7.102 ± 0.721; p= 0.0001.
5j	6	6.403 ± 0.812; p= 0.005.
ANOVA à deux facteurs		
- Effet du stress	F(1, 58)= 1.460; p= 0.0001.	
- Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress.	F(2, 58)= 0.874; p= 0.422.	
- Interaction entre les deux facteurs	F(2, 58)= 13.024; p= 0.0001.	

NINS: Non immunisés non stressés.
INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.

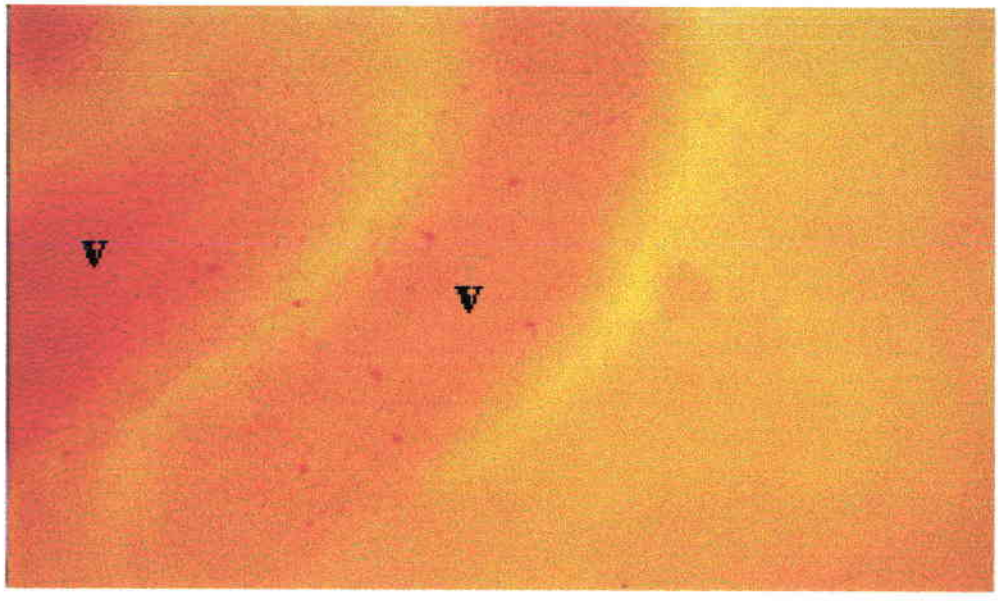


Photo. n°1. Photomicrographie de l'estomac d'une souris non stressée expérimentalement (x 60). La photo montre une villosité stomacle (V) présentant quelques inflammations gastriques.

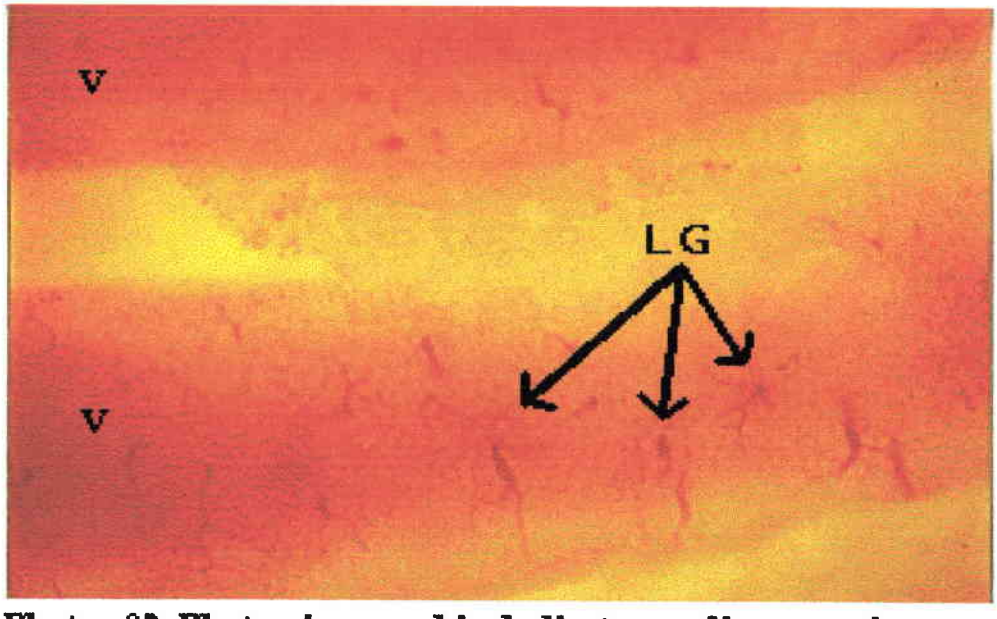


Photo.n°2. Photomicrographie de l'estomac d'une souris exposée à un stress expérimental (x 60). La photo montre une villosité stomacale (V) présentant plusieurs inflammations gastriques. LG: lésions gastriques.

Tableau 6. Effet de l'immunisation sur le comportement général des animaux non stressés dans les tests de l'escalier et de la chambre claire/obscure.

	Test de l'escalier						*Test de la chambre claire/obscure*								
	1j après l'immunisation		3j après l'immunisation		5j après l'immunisation		1j après l'immunisation			3j après l'immunisation			5j après l'immunisation		
	MM	**Rd**	**MM**	**Rd**	**MM**	**Rd**	**Rd**	**Trs**	**Tps/cl**	**Rd**	**Trs**	**Tps/cl**	**Rd**	**Trs**	**Tps/cl**
NINS															
Moy ± SEM	25.750 ± 1.830	25.750 ± 1.943	26.667 ± 1.706	27.429 ± 1.8110	23.750 ± 0.463	24.000 ± 1.000	22.000 ± 1.250	10.750 ± 0.860	95.000 ± 9.100	18.250 ± 1.540	9.330 ± 0.590	123.00 ± 8.200	22.750 ± 4.440	11.750 ± 0.660	135.00 ± 5.300
INS															
Moy ± SEM	29.000 ± 2.507	31.000 ± 4.050	22.143 ± 2.650	30.857 ± 2.865	23.857 ± 3.327	25.500 ± 1.893	25.000 ± 0.960	11.000 ± 0.680	90.000 ± 9.300	24.500 ± 2.800	13.000 ± 1.220	80.000 ± 4.800	25.550 ± 2.540	10.800 ± 0.696	91.030 ± 7.900
p	p=0.300	p=1.460	p=0.200	p=0.360	p=0.970	p=0.780	p=0.040	p=1.000	p=0.510	p=0.050	p=0.370	p=0.040	p=0.210	p=0.560	p=0.230
	Anova à un facteur : Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress MM : F(5, 37)= 1.202; p= 0.327. Rd: F(5, 36) = 1.036; p= 0.397.						**ANOVA à un facteur** : Effet de l'intervalle entre l'immunisation et le stress Rd: F(5, 46)= 2.394 ; p= 0.166. Trs: F(5, 42)= 2.015 ; p= 0.096. Tps/cl: F(5.44)=2.485; p=0.087								

NINS: Non immunisés non stressé; INS : Immunisés non stressés.
MM : Marches montées, Rd : Redressements. Trs : Transitions, TPS/CI : Temps dans le clair.
N=10x12 lots. $p<0.05$ est considéré significatif. Durée totale de chaque test est de 5 min.

UNIVERSITE DE METZ S.C.D.

4-2. Les effets du stress expérimental sur le comportement général de l'animal dans les tests de la chambre claire/obscure et l'escalier

Comme le montre le Tableau.10, le nombre des transitions effectuées entre les deux compartiments du test de la chambre claire/obscure diminue significativement chez les animaux stressés. Nous avons constaté aussi que le stress expérimental réduit de façon significative le nombre des redressements dans le compartiment clair par rapport aux animaux non stressés. Contrairement aux deux précédents paramètres cités ci-dessus, le temps passé dans le compartiment clair, augmente significativement chez les animaux stressés. Ce résultat laisserait supposer que le stress engendre une certaine immobilisation comportementale de l'animal dans le compartiment clair du test de la chambre clair/obscure.

***Tableau. 10** Effet du stress expérimental appliqué à court terme sur le comportement général de la souris dans le test de la chambre claire/obscure.*

	Nombre des animaux utilisés	*Redressements/clair*	*Temps/clair (en sec)*	*Transitions*
Non stressés *Moy ± SEM*	10	27.126 ± 1.400 ///	91.900 ± 9.395 ///	10.800 ± 0.860 ///
Stressés *Moy ± SEM* *t-test* *p*	10	18.000 ± 1.020 ***t-test***= 7.946 ; p=0.0001	177.700 ±18.372 ***t-test***= -6.386; p= 0.0001.	6.857 ± 0.459 ***t-test***= 6.199; p=0.0001

Les résultats du Tableau 11 montrent que le stress expérimental, provoque une diminution du nombre des redressements et celui des marches montées effectués par les animaux dans le test de l'escalier.

Tableau 11. Effet du stress expérimental appliqué à court terme sur le nombre des marches montées et des redressements effectués par les animaux dans le test de l'escalier.

	Nombre des animaux utilisés	***Redressements***	***Marches montées***
Non stressés *Moy ± SEM*	10	22.625 ± 1.782 ///	27.750 ± 2.177 ///
Stressés *Moy ± SEM* *t-test* *p*	10	16.571± 2.716 *t*-test=2.954; p=0.012	13.000 ± 3.078 *t*-test=4.030;p=0.001

D. Conclusion

Ce travail montre pour la première fois chez la souris, que le stress expérimental (répétitif, inévitable et douloureux), affecte simultanément les réponses immunitaires, gastriques et comportementales, avec un optimum d'effets à 1j après l'immunisation chez la souris.

Concernant les effets du stress sur l'immunité cellulaire, nous avons montré une réduction de la valeur absolue de toutes les catégories leucocytaires sauf les éosinophiles dont la valeur absolue a plutôt augmenté après l'application du stress. Nous avons montré aussi une augmentation de la concentration plasmatique des anticorps totaux quand le stress est appliqué 1j après l'immunisation.

Cette première étude s'est intéressée aussi aux effets du stress sur l'état de la muqueuse gastrique et sur le comportement général de la souris. Nos résultats ont montré d'une part, une diminution de l'activité locomotrice et exploratoire et d'autres part, une potentialisation de l'inflammation de la muqueuse gastrique chez la souris.

Ces résultats montrent également qu'une fois un modèle de stress expérimental est validé, il apparaît possible d'étudier les effets de ce même modèle de stress sur d'autres fonctions.

PARTIE. II

Etudes des effets du stress physique et psychosocial, sur les réponses comportementale, gastrique, endocrinienne et immunitaire.

A. Définition des objectifs

L'objectif principal de cette partie de notre étude est d'une part, de valider un deuxième modèle de stress de manière à le comparer avec le modèle étudié précédemment et d'autre part, de comparer les conséquences des deux types de stress (physique et psychosocial) appliqués à court terme et à long terme sur les différentes réponses comportementales, gastriques, immunitaires et endocriniennes chez la souris.

On peut ainsi subdiviser cet objectif général en objectifs plus spécifiques de la manière suivante :

- Etudier les effets du stress (physique et psychosocial) sur le comportement général de la souris.

- Rechercher les effets du stress (physique et psychosocial) sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez la souris.

- Evaluer les effets des deux types de stress sur la concentration plasmatique de la corticostérone, l'adrénaline et de la noradrénaline.

- Etudier l'état des surrénales et celui de la muqueuse gastrique des animaux stressés (physique et social).

- Etudier et comparer les conséquences des deux types de stress sur le taux de la β endorphine au niveau de l'antéhypophyse (voir Annexe technique).

B. Matériels et méthodes

1. Recherche des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme et à long terme sur le comportement général de l'animal

Après validation de l'intervalle séparant l'immunisation et l'application du stress pour les trois fonctions, comportementale, gastrique et immunitaire. Nous avons retenu l'application du stress (stress physique et psychosocial) 1j après l'immunisation pour la suite des travaux.

1-1. Procédure du stress

1-1-1. Stress physique (voir partie I)

1-1-2. Stress psychosocial

Le protocole consiste à isoler les animaux individuellement, dans des cages rectangulaires (26x13x8cm) situés dans des isoloires pour une durée de 4 heures pendant la phase obscure (13h-17h). L'eau et la nourriture sont fournies à volonté. Ensuite on évalue leur comportement à l'aide des deux tests comportementaux suivants :

1-2. Test de la chambre claire/obscure

1-2-1. Matériels

Le dispositif expérimental consiste en une enceinte en Plexiglas opaque composé de deux compartiments, l'un obscure (27x18x29cm) et l'autre fortement éclairé (27x27x29cm) les deux compartiments sont reliés par une petite porte permettant à l'animal de passer librement de l'un à l'autre.

1-2-2. Méthodes

Trente minutes, avant le test l'animal est prélevé de sa cage d'élevage pour être introduit dans l'enceinte éclairée. Son comportement est alors observé pendant 5 minutes (temps global).

Les paramètres pris en compte sont :

a. Le temps passé dans le compartiment clair et obscure : il est constitué par le cumul du temps passé par l'animal sous la lumière ou dans l'obscurité pendant le temps global d'observation.

b. Le nombre de transitions effectuées par l'animal (nombre de passages du compartiment obscure au compartiment éclairé).

c. Le nombre de redressements effectués par l'animal dans le compartiment éclairé et obscure.

d. L'activité locomotrice effectuée par l'animal dans les deux compartiments clair et obscure (les deux compartiments sont subdivisées en cases, le passage d'une case à l'autre, est considéré comme une locomotion).

1-3. Test de l'escalier (voir partie.I)

2. Recherche des effets du stress physique et psychosocial appliqués à court terme et à long terme sur l'état des surrénales et celui de la muqueuse gastrique chez la souris.

Dans le but d'étudier les effets du stress sur le plan tissulaire et cellulaire, nous avons eu recours à la technique histologique (Hématoxyline-Eosine) et nous avons dû procéder à la mise au point de cette dernière sur le tissu stomacal et surrénalien.

2-1 Coupes histologiques de l'estomac et des surrénales avec coloration standard systématique (HE : Hématoxyline Eosine)

2-1-1. *Fixation*

La fixation représente le temps essentiel de la technique histologique. Fixer une cellule, c'est la conserver dans un état aussi proche que possible de l'état vivant :

- En la protégeant de l'attaque bactérienne Gram$^-$.
- En s'opposant à l'autolyse de constituants fondamentaux sous l'effet des enzymes cellulaires.

Pour que la fixation soit efficace, il faut prévoir un volume de fixateur 10 à 40 fois supérieur au volume de la pièce. La pièce sera plongée dans le fixateur et non mise dans le flacon vide puis recouverte de fixateur, ceci pour éviter qu'elle n'adhère aux parois du flacon.
Le fixateur utilisé est le formol à 10 %.

2-1-2. *Imprégnation à la paraffine*

C'est le VIP 200 qui effectue l'imprégnation en cycle de nuit. C'est un automate à « mouvements de fluides » c'est à dire que les différents produits utilisés vont être successivement aspirés puis refoulés dans la cuve de traitement par des phénomènes physiques tels que «vide» et « pression » sans que la moindre vapeur ne soit rejetée dans l'atmosphère.
Les cassettes de prélèvements, placées dans un panier métallique, vont être déposées dans la cuve du VIP 200 (contenance 200 cassettes) puis traitées par les bains suivants , durant le cycle de nuit :
- 4 bains d'alcool 95 °.
- 2 bains d'alcool absolu (butanol).
- 3 bains de toluène.
- 4 bains de paraffine à 56°C.

Lorsque le cycle est terminé, le panier baigne dans la paraffine à 56°C. Les prélèvements sont alors prêts à être inclus.

2-1-3 Inclusion

On dépose une cassette sur la platine thermostatée à 56°C. On dépose son contenu dans un moule métallique de taille adéquate préalablement rempli de paraffine liquide au distributeur, à l'aide d'une pince réchauffée à la flamme.

Une fois le prélèvement positionné dans le moule, on va le placer sur la plaque réfrigérante à 0°C pour faire refroidir et donc durcir la paraffine. Bien refroidis, les blocs sont démoulés et prêts à être coupés.

2-1-4. *Coupe-Etalement-Séchage*

Le microtome est un appareil de haute précision. Il se compose d'un support de bloc mis en mouvement vertical grâce à une première manivelle, et un support de lame mis en mouvement horizontal grâce à une deuxième manivelle.
Lorsque le bloc est positionné sur son support, on va «débiter» le bloc jusqu'à avoir tout le prélèvement sur le plan de coupe. Une fois ce but atteint, on va faire des coupes de 6 microns d'épaisseur. Le but recherché est d'obtenir un ruban de coupes dont la forme reflète complètement celle du bloc. Ce ruban de coupes est ensuite déposé sur une lame porte-objet préalablement recouverte d'albumine à 2%. Cette albumine sert à la fois de milieu d'étalement et de colle lors du séchage. L'étalement s'effectue sur une platine chauffante (température inférieure à 50°C. On laisse sécher les coupes étalées à 56°C pendant 30 min.

2-1-5. *Colorations*

2-1-5-1. Déparaffinage et réhydratation

Après séchage, les coupes sont en milieu hydrophobe qui est la paraffine. Lors des colorations, un produit au moins se trouve en milieu aqueux; il faut donc éliminer la paraffine par du toluène. Ce dernier n'étant toujours pas miscible à l'eau, il faut introduire un bain d'alcool intermédiaire à 95° qui fera la jonction entre le toluène et l'eau. Les coupes ainsi réhydratées, peuvent être colorées.

2-1-5-2. Coloration standard systématique: HE

C'est une coloration à base d'hématoxyline-éosine, effectuée systématiquement sur toutes les coupes, la méthodologie se fait selon le schéma suivant : (Fig. 24)

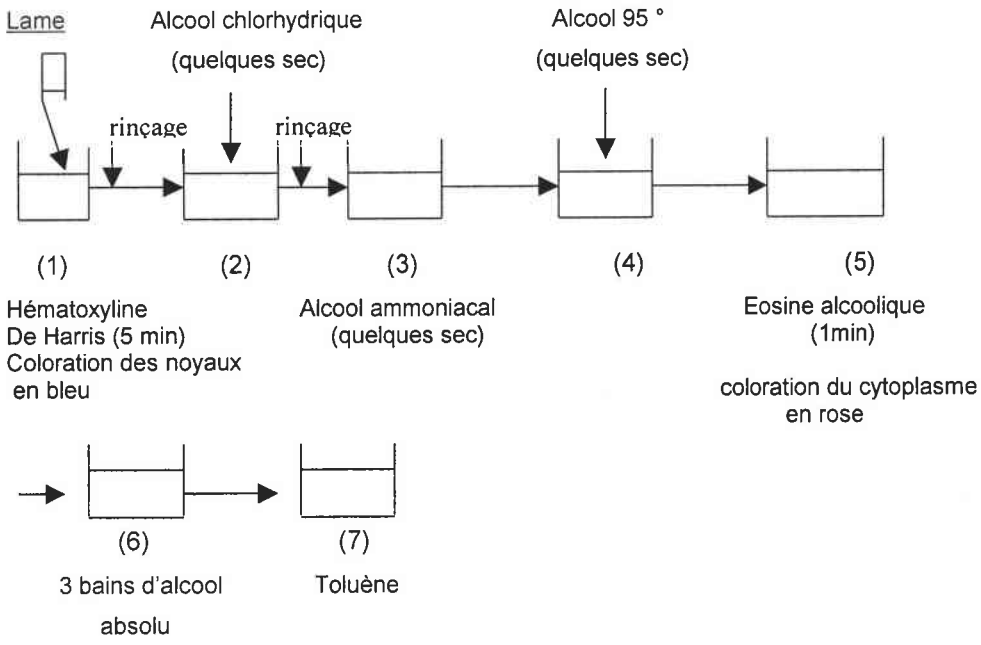


Fig. 24 Schéma représentant les principales étapes de la procédure de la coloration standard à hématoxyline éosine (HE)

2-1-5-3. Montage des lamelles

En fin de coloration, les lames se retrouvent dans le toluène, totalement déshydratées. On colle une lamelle couvre-objet à l'aide d'une résine synthétique : le Baume d'Eukitt. Ce Baume met plusieurs jours pour sécher complètement. Mais après séchage d'une semaine, les lames sont prêtes pour l'observation microscopique.

3. Recherche des effets du stress physique/psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur l'immunité cellulaire de l'animal.

3-1. Comptage des cellules sanguines : *Numération formule sanguine*.

(voir partie. I)

3-2. Comptage des souspopulations lymphocytaires: *Cytométrie de flux* (CMF)

3-2-1. Rappel de la cytométrie de flux

3-2-1-1. Historique

Le développement et l'application des systèmes de CMF à l'analyse et à la séparation automatisées des cellules ont ajouté de nouvelles dimensions à la recherche médicale et biologique. Cette technologie représente une amélioration par rapport aux techniques cytophotométriques basées sur l'utilisation du microscope. Grâce à ces systèmes de CMF, l'analyse des populations s'effectue cellule par cellule à très grande vitesse (jusqu'à 10000 évènements par seconde) ce qui permet une forte précision statistique.
Les progrès récents dans l'instrumentation, dans les préparations et colorations cellulaires font de cette technique une méthode de choix dans l'analyse de propriétés cellulaires, de composants sub-cellulaires et de métabolismes cellulaires.

3-2-1-2. Définition de la CMF

La CMF peut se définir comme une technique permettant la caractérisation individuelle de particules dans un milieu liquide après excitation lumineuse des particules. L'originalité de cette technologie réside d'une part dans la possibilité d'analyser à de haute vitesses de passage, un nombre élevé de particules assurant ainsi reproductibilité et précision statistique à l'analyse. D'autre part, cette technique permet la réalisation de mesures multi-paramètriques qualitatives et quantitatives d'une population cellulaire. La puissance séparative de cette technique, ou tri cellulaire, permet la séparation physique de sous populations de l'échantillon étudié.

3-2-1-3. Principe de la technique

Le schéma du principe du cytométre en flux incluant la fonction de tri est présenté dans la Fig. 25. Les cellules en suspension sont injectées par pression différentielle dans une veine liquide (liquide de gaine ou sheat fluid) afin de les aligner au centre de la gaine (focalisation hydrodynamique) et à les entraîner une par une devant le faisceau laser pour assurer une illumination homogène. Chaque cellule interceptée par le faisceau laser émet des signaux de diffusion et de fluorescence (naturels ou acquises par un marquage préalable); les différents signaux émis sont alors dissociés sur la base de leur longueur d'onde par un filtrage optique composés de filtre et de miroirs , captés par des photodétecteurs, transformés en signaux électroniques, et visualisés après amplification sur l'écran d'un système informatique pour être présenter à l'utilisateur. Après excitation des cellules, et analyse des différents signaux émis qui permettent de définir l'appartenance d'une cellule à l'une ou à l'autre des sous-populations (fluorescence 1 « population 1 » ou fluorescence 2 « population 2 »), un cristal piézo-électrique fractionne le jet de cellules en gouttelettes homogènes, chacune contenant au maximum une cellule. En fonction des caractéristiques de ces cellules, les gouttelettes sont chargés positivement (si la cellule appartient à la population 1) ou négativement (pour les cellules de la population 2) par un anneau de charge. Les gouttelettes contenant des cellules non apparentées aux sous-populations 1 ou 2 ne reçoivent pas de charge. Les gouttelettes passent ensuite à travers des plaques de déflection (champs électrique très puissant) et se trouve alors dévié en fonction de leur charge vers deux réceptacles différents. Les gouttelettes non chargées, suivent une trajectoire non modifiée et sont conduites vers un récipient d'élimination.

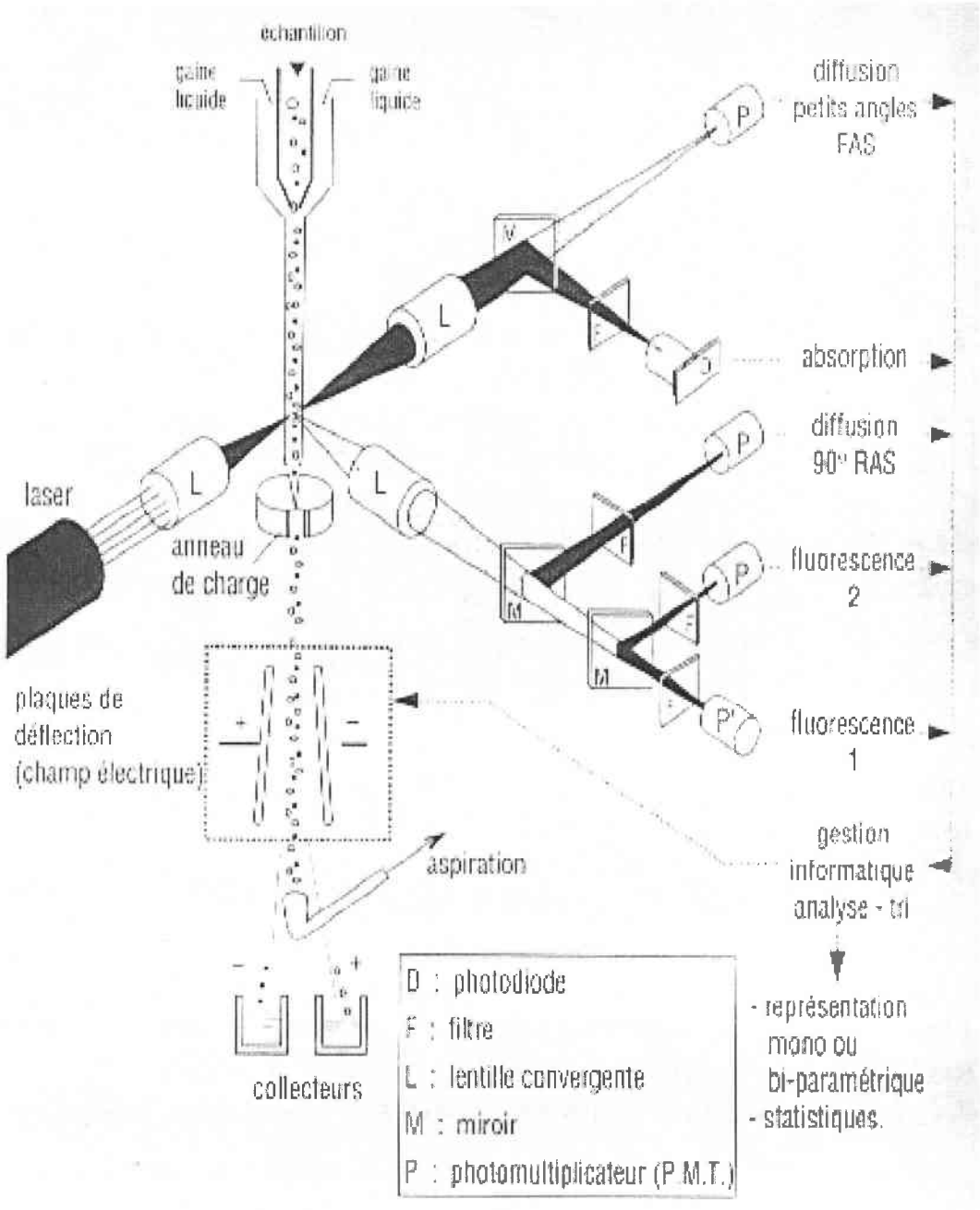


Fig. 25 Schéma du principe d'un cytofluorimètre

(d'après Genetet ; Immunologie ; 1997)

b. Paramètres étudiés

La CMF mesure des signaux optiques dont l'intensité dépend de caractéristiques cellulaires. La cellule intercepte le faisceau lumineux incident et remet différents signaux.

- Caractéristiques morphologiques : Lumière diffusée dans différentes directions par rapport aux rayons incidents

Sous un petit angle (<12°) : L'intensité de ce faisceau peut être corrélée avec le diamètre de la cellule ce qui permet de la différencier des agrégats, des débris et des cellules mortes (qui diffusent moins de lumière): paramètre appelé FSC (forward scatter).

Sous un angle droit : ce qui permet de fournir des données sur la granularité ou le rapport nucléocytoplasmique de la cellule : paramètre appelé : SSC (side scatter). L'analyse de ces deux paramètres ne nécessite pas de marquage cellulaire, sur la base de leurs caractéristiques morphologiques, cette technique peut définir les différentes sous populations cellulaires d'un échantillon (Fig. 26).

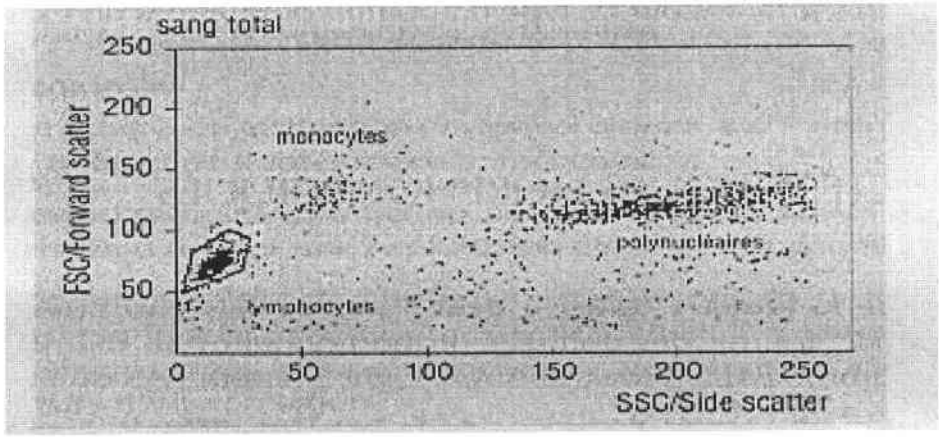


Fig. 26 Représentation biparamétrique ou cytogramme de cellules de sang périphérique (d'après Genetet ; Immunologie ; 1997)

- Caractéristiques fonctionnelles : Lumière absorbée par la cellule

Elle se révèle proportionnelle au diamètre de la cellule supposée sphérique, elle dépend bien entendu de l'indice d'absorption des constituants cellulaires.

c. La fluorescence émise par la cellule

Celle ci peut être émise spontanément, c'est le phénomène d'autofluorescence ou plus fréquemment, elle peut être provoquée par différents artifices techniques tels que l'utilisation des fluorochromes. Ces fluorochromes peuvent avoir une affinité pour un constituant de la cellule ce qui augmente son intensité de fluorescence (comme dans notre étude celle du thiazole orange pour l'ARN). Cette affinité peut être apportée grâce à la liaison d'un fluorochrome avec un anticorps ou un ligand pour lequel il existe un récepteur cellulaire. Ces paramètres impliquent des modifications du spectre d'émission, d'excitation et du rendement quantique et peuvent être à l'origine de nouvelles applications de la CMF.

d. Marquage par un fluorochrome :

La molécule à identifier est mise en évidence par la liaison d'un anticorps spécifique couplé à un fluorochrome .

- *Immunofluorescence directe*

L'anticorps spécifique de la molécule analysée est directement lié à un fluorochrome.

- *Immunofluorescence indirecte*

L'anticorps spécifique de la molécule étudiée est révélé par un deuxième anticorps couplé à un fluorochrome : deux étapes de marquage sont nécessaires.

e. Traitement des données

Les informations relatives à chaque cellule sont visualisées soit sous forme mono-paramétrique ou histogramme, courbe de distribution d'un paramètre en fonction du nombre des cellules analysées, soit sous forme biparamétrique ou cytogramme, deux paramètres sont corrélés.

f. Avantages de la CMF

La cytométrie en flux permet de détecter et de quantifier avec précision des sous-populations cellulaires ainsi que l'estimation de la population moyenne. La CMF fait la différence entre une faible augmentation de l'expression d'un marqueur d'activation pour l'ensemble des cellules et une augmentation importante du même marqueur par une petite fraction de la population.

- Facilité et rapidité

Certaines analyses peuvent être directement effectuées sur le sang total. Pour les autres, la préparation de la suspension cellulaire à partir de sang total ne parait pas être un obstacle. La rapidité de l'analyse est un avantage certain par rapport aux méthodes traditionnelles (la vitesse de passage peut être de 20 à 10 000 cellules par seconde dans un échantillon de concentration).

- Sensibilité

La CMF fournit une échelle d'intensité comprenant de 256 à 1024 canaux et est donc capable de détecter des signaux beaucoup plus faibles qu'en microscopie de fluorescence qui n'utilise qu'une échelle qualitative (négatif, Positif, moyen, fort); la CMF rend un résultat quantitatif.

- Préservation de l'intégrité cellulaire

Des types cellulaires représentant des pourcentages de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} peuvent être analysés sans enrichissement préalable ni purification, et sans risque associé de pertes sélectives ou de diminution de fonction cellulaire.

- Mesure simultanée de plusieurs signaux

Elle constitue un autre avantage et peut permettre d'identifier deux sous populations lymphocytaires (par exemple) dans le même échantillon grâce à la technique du double marquage (anti-lymphocytes auxiliaires TCD4 et anti-lymphocytes cytotoxiques TCD8 par exemple).

- Tri cellulaire

Il permet le recueil dans des conditions vitales de populations pures suivant des critères déterminés de l'analyse. Le recueil de population cellulaire très pure (pureté >95%) tout en préservant l'intégrité et leur viabilité.

- La possibilité de réaliser un clonage.
- L'établissement de banques chromosomiques.

g. Principales limites de la CMF

De nombreuses limites résident dans la préparation de suspensions cellulaires à partir de tissus solides, qui peut entraîner une modification du marqueur et de son micro-environnement. Le signal lumineux émis par la cellule ne renseigne pas sur la distribution intracellulaire du fluorochrome; le cytométre peut alors prendre en compte des amas cellulaires ou des débris qui, en microscopie auraient été éliminés.

De nombreuses limites concernant l'appareillage et les fluorochromes utilisées sont à prendre en compte telles que le rendement quantique, le système optique, le choix des filtres...

3-2-2. Méthodologie

3-2-2-1. *Principe*

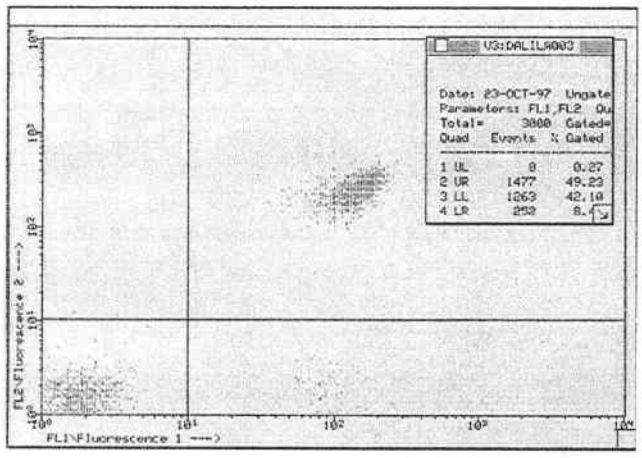
Il convient tout d'abord de marquer le sang total avec des anticorps monclonaux conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et/ou à la phycoérythrine (PE) pour détecter des cellules porteuses d'antigènes membranaires spécifiques.
Après marquage et lyse, on a établi une fenêtre excluant les débris, les globules rouges nuclées, les plaquettes, les monocytes et les granulocytes sur la base de valeurs de diffraction et de volume. On a compté entre 3000 et 5000 événements. On a ensuite établi un histogramme indiquant le nombre d'événements comptés et l'intensité de fluorescence pour les cellules marquées par l'anti-anticorps monoclonal. On a exprimé le chiffre des cellules positives en pourcentage du nombre total de lymphocytes comptés.

3-2-2-2. *Préparation*

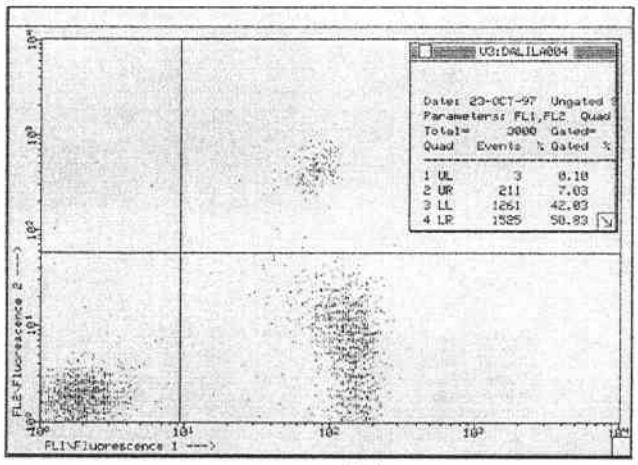
Dans des tubes de 3 ml, on a déposé 50µl de sang total à analyser. On a introduit la quantité d'anticorps monoclonal recommandée par le fabriquant (Immunotech :4µl). Ensuite, on agite et on incube à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 15 min. On ajoute 2 ml de solution de lyse FACS diluée, et on incube 10 min comme précédemment ; 10 min plus tard, on centrifuge 5 min à 2000tr/min à 25°c.
Enfin, on ajoute 3 ml de PBS et on centrifuge à 2000 tr/min encore une fois pendant 5 min.

3-2-2-3. *Lecture* (Fig. 27)

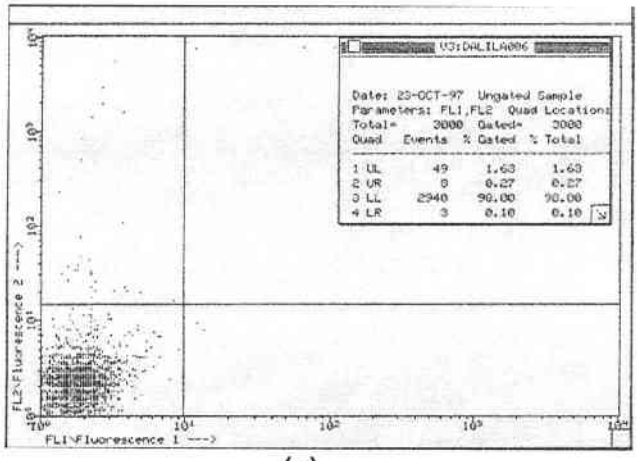
On ajoute 0.3 ml de PBS à température ambiante, on vortexe doucement et on analyse au FACS (cytométre de flux).



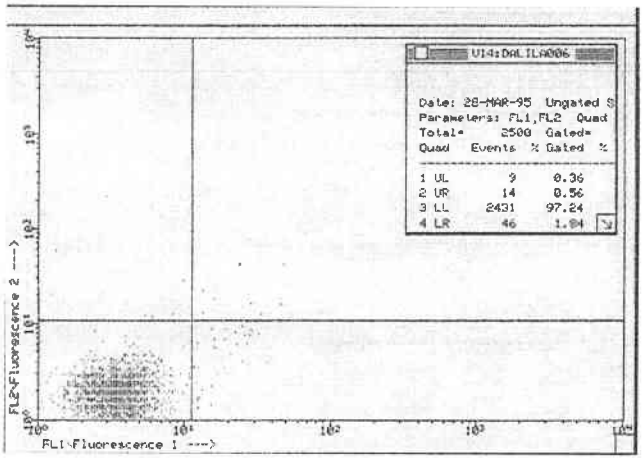
(a)



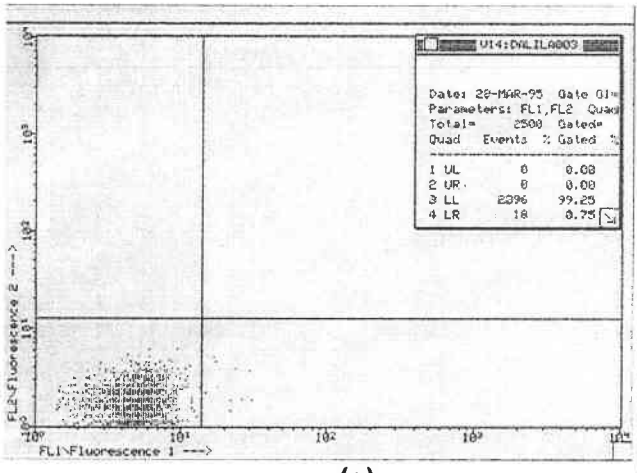
(b)



(c)



(d)



(e)

Fig. 27 Analyse en double immunofluorescence chez des animaux non stressés.

(a): lymphocytes T auxiliaires (T CD4) ; (b) : lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs (TCD8) ;

(c) : Cellules naturelles tueuses (NK) ;(d) Témoin négatif de l'aniticorps anti -TCD4;

(e) :Témoin négatif de l'anticorps anti-NK.

4. Recherche des effets du stress physique et psychosocial sur la réponse endocrinienne chez la souris.

4-1. Dosage de la corticostérone par RIA au tritium après une extraction et chromatographie sur Célite (Dosage réalisé chez Pasteur Cerba à Paris).

Protocole opératoire pour le dosage de la corticostérone plasmatique :

1) Extraction par un mélange cyclohexane/acétate d'éthyle (50/50),
2) Chromatographie sur colonne de célite,
3) Dosage RIA avec des anticorps anticorticostérone de lapin par compétition avec un traceur marqué au tritium,
4) Comptage sur compteur bêta en scintillation de proximité (SPA).

Sensibilité= 0.5 nmol/l.

Gamme d'étalonnage : de 0à 28.90 nmol/l.

4-2. Dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline chez des animaux stressés par chromatographie liquide à haute pression (HPLC)

La technique de dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline, utilisée dans cette étude, est la chromatographie liquide à haute pression couplée à la détection électrochimique.

4-2-1. Présentation de l'appareillage

Le système chromatographique utilisé est une chaîne Waters R (Waters, Bedford, Etats unis) comprenant :

- Une pompe à pistons, en opposition de phase (modèle 510), dont le débit peut varier de 0.1 à 9.9 ml par minute la pompe, dont le débit de travail est de 0.8 ml par minute, est munie d'un filtre de basse fréquence rendu nécessaire en détection électrochimique, car toute oscillation du débit entraîne des variations de pression qui perturbent la détection et font varier la ligne de bas. Dans notre système, la pression de travail est stabilisée à 125 bars.

- Un injecteur manuel (modèle U6K), permettant des volumes d'injection d'échantillon de 1 à 100 ml. Dans notre protocole, le volume des injections est standardisé à 25 µl.

- Une colonne (Resolve R, 150x3.9 mm) remplie de grains de silice d'une granulométrie de 5 µm et greffés par des chaînes carbonées de 18 atomes.

- Un détecteur électrochimique (modèle 460) comprenant trois électrodes et basés sur le modèle de détecteur en couche mince de Kissinger (Ehrenström, 1988).

- une électrode de mesure.
- une électrode de référence (KCL 3M).
- une électrode auxiliaire.

L'électrode auxiliaire sert à compenser la chute ohmique (chute de résistivité) due au milieu entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence.
Elle mesure la différence de potentiel entre ces deux électrodes et la maintient égale à celle à respecter pour l'électrolyse du soluté qui traverse la cellule, soit 0.6 volt.

4-2-1-1. *La phase mobile*

La phase mobile utilisée a la composition suivante :
- Méthanol RS HPLC (Carlo Erba, Milan, Italie) « 80ml »
- Eau tri-distillée « 920 ml »
- Phosphate monosodique (Merck, Damstadt, Allemagne) «13.8g»
- EDTA disodique (Merck, Damstadt, Allemagne) « 18.6mg »
- Octyl sulfate de sodium (Sigma, Saint louis, Etats unis) «250mg »

Le phosphate monosodique joue le rôle de tampon éliminant toute variation de pH de la phase lors de l'injection des échantillons (pH 4.5).

L'octyle sulfate de sodium est le contre ion utilisé. Sa concentration dans la phase mobile détermine la sélectivité du système chromatographique. En contre partie, il augmente le temps de rétention. Le méthanol permet de diminuer le temps d'analyse chromatographique en favorisant l'élution, sans affecter la sélectivité (le temps d'analyse est de 15 min par échantillon).

A cette concentration, L'EDTA permet de chélater les particules métalliques susceptibles d'altérer la détection électrochimique.

La phase mobile est filtrée (filtre Sartorius de 0.45 µm de porosité, Göttigen, Allemagne) et dégazée sous vide chaque jour avant le début de la manipulation. La phase mobile est renouvelée tous les 7 jours.

4-2-1-2. *Les standards*

- Solution NAD 0.5 mg/ml dans HClO4 0.3 N.
- 3.4 dihydroxybenzylamine (DHBA), PM=220.10.
- Noradrénaline Bitartrate PM=337.29.
- Adrénaline HCL PM= 333.3.

Ces produits nous ont été fournis par les laboratoires (Sigma Chemical, Saint Louis, Etats Unis).

4-2-2. Protocole d'extraction de la noradrénaline et de l'adrénaline

Les catécholamines ont la particularité d'être absorbées sélectivement sur l'alumine à un pH élevé pour former un complexe stable. Cela permet de laver l'alumine et d'éliminer les composés indésirables de l'échantillon. Les catécholamines peuvent ensuite être relargués de l'alumine par addition d'acide dilué. L'éluant est ensuite injecté dans le système chromatographique.

Préparation des solutions pour l'extraction:

- 15 mg d'alumine oxyde,
- 100 µl de BSNA 1 %,
- 75 µl de EDTA 10 %,
- 1.025 ml 0.1 M PCA,

- 100 µl de plasma,
- 50 µl du DHBA (D) ou mélange (NAD pour la solution NAD),
- 0.6 ml Tris 2 M (pH 8.6).

On vortexe et on agite les tubes par retournement 30 min à 4°C.

4-2-3 Détermination de la concentration plasmatique de la noradrénaline et de l'adrénaline

Le dosage de la noradrénaline et de l'adrénaline plasmatique est effectué sur 100 µl de plasma après centrifugation du sang total.
Ce dosage a été réalisé selon la technique décrite par Ehrenström (1988).
Les plasmas sont décongelés à 4°C, puis sont additionnés. Dans chaque tube :
- 15 mg d'oxyde d'alumine (clinrepR, Recip, Pharma Vertriebe, Munuich, Allemagne),
- 100 µl d'une solution D'EDTA (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Allemagne)
- 5% (0.13 M) de Bisulfite de sodium (Msodium (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- 250 µl d'eau tridistillée
- 250 µl de tampon Tris-HCl 2 M à pH 8.8.

Les tubes sont alors agités par retournement pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et à +4°C. L'alumine est ensuite lavée trois fois par de l'eau tri-distillée à +1°C. Après aspiration de la troisième eau de lavage, 50 µl d'acide perchlorique 0.1M sont additionnés à l'alumine et agités pendant 10 secondes au vortex. Après sédimentation de l'alumine, l'acide est repris et filtré (microfiltre millipore d'une porosité de 0.45 µm, Bedford, Etats unis). Les échantillons sont stockés à -4°C et 25 ml sont injectés dans le système chromatographique au plus tard 4 heures après l'extraction.

4-2-4. Expression des résultats

L'extraction sur alumine ne permettant pas de recueillir à 100 % la noradrénaline, l'adrénaline et le DHBA; le rendement d'extraction, identique pour les standards et les échantillons de noradrénaline et d'adrénaline inconnus à doser, peut ainsi être calculé. La noradrénaline, l'adrénaline et le DHBA sont en solution mère dans l'acide

perchlorique 0.1 M. Ces derniers sont conservés à -80°C pour une période maximale de 90 jours.

4-2-4-1. Extraction des standards pour la mesure de la noradrénaline, l'adrénaline plasmatiques

Un « pool » de plasma, dépourvu de noradrénaline, a été constitué. L'élimination de la noradrénaline est obtenue en maintenant le plasma à 60°C pendant 1 heure. Une extraction sur alumine de 100 µl de ce plasma a permis de vérifier l'absence de la noradrénaline et de l'adrénaline.

En plus de 50 µl du NAD préparé à partir de la noradrénaline, de l'adrénaline et du DHBA, les tubes contiennent:

10 µl de HCLO4 2.4M, 160 µl de HCLO4 0.2 M.

On centrifuge ces tubes à 4000tr/min pendant 10 min à 4°c.

Ensuite pour extraire les catécholamines, on ajoute:

15 mg d'oxyde d'alumine, 100 µl de BSNA à 1 %, 100 µl de plasma sans noradrénaline, 75 µl d'EDTA à 10 %, 0.6 ml Tris 2 M pH 8.6, 1.025 ml de PCA et 50 µl de DHBA.

Les tubes sont alors agités par retournement, pendant 15 min. Le protocole de lavage et d'élution de la noradrénaline, de l'adrénaline et du DHBA standards, est identique à celui des échantillons de plasma.

4-2-4-2. Mesure de la noradrénaline, l'adrénaline inconnues

Les chromatogrammes sont enregistrés sur papier (Servotrace, Sefram, Paris France). Les pics de noradrénaline, d'adrénaline et du DHBA sont mesurés en millimètres.

Le calcul est le suivant : concentration de l'adrénaline et de la noradrénaline.

[Ad]= $\frac{H\ Ad_{ech}/H\ D_{ech} \times Rdt\ D/Rdt\ Ad \times D\ injecté \times D_f/v_p}{H\ AD_{NAD}/H\ D_{NAD}}$

[Ad]: concentration de l'adrénaline en pg/ml.

$H\ Ad_{ech}$: hauteur du pic de l'adrénaline de l'échantillon en mm.

$H\ D_{ech}$: hauteur du pic du standard interne dans l'échantillon en mm.

$H\ AD_{NAD}$: hauteur du pic de l'adrénaline du mélange NAD en mm.

$H\ D_{NAD}$: hauteur du pic du standard interne dans le mélange NAD en mm.

$Rdt\ D = H\ D_{P0} / H\ D_{NAD}$

$H\ D_{P0}$: Hauteur du pic du standard interne dans le plasma qui ne contient pas de catécholamines.

$H\ D_{NAD}$ = Hauteur du pic du standard interne dans le mélange NAD en mm

$Rdt\ Ad = H\ Ad_{P0} / H\ Ad_{NAD}$

$H\ Ad_{P0}$: Hauteur du pic de l'adrénaline dans le plasma qui ne contient pas de catécholamines.

$H\ Ad_{NAD}$: Hauteur du pic de l'adrénaline dans le mélange NAD en mm.

D: quantité du standard interne injectée (280 pg dans 25 µl injectée).

Df: facteur de dilution.

Vp: volume plasmatique utilisée.

Cette formule est valable pour calculer aussi la concentration de la noradrénaline.

C. Résultats

1. Les effets du stress physique/psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur le comportement général de l'animal.

1-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur le comportement général de la souris dans les tests de la chambre claire/obscure et de l'escalier.

1-1-1. Test de la chambre claire/obscure

1-1-1-1. Stress physique

La Fig. 28 montre que le stress physique agit différemment sur le nombre des transitions quand il est appliqué à court terme (1j) ou à long terme (4j et 10j successifs). En effet, le nombre des transitions effectuées par les animaux stressés à long terme (4j et 10j), a plutôt tendance à augmenter par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur: $F(5, 27)= 8.318$; $p= 0.0001$). On a plutôt tendance à supposer que le stress appliqué à court terme, entraîne une diminution du nombre des transitions et par conséquent une inhibition comportementale, alors que le stress appliqué à long terme (4j et 10j) entraîne plutôt une augmentation du nombre des transitions et par conséquent une activation comportementale.

Concernant les redressements, la Fig. 29 montre que le stress physique a tendance à diminuer de façon significative le nombre des redressements effectués dans le compartiment clair à toutes les durées de stress par rapport aux animaux non stressés (1j, 4j et 10j) : ANOVA à un facteur : $F(5, 39)= 61.283$; $p= 0.0001$. Cependant, ces résultats montrent aussi que le nombre des redressements dans le compartiment obscure augmente en particulier chez les animaux soumis au stress physique pendant 10j successifs: ANOVA à un facteur : $F(5, 32)= 5.417$; $p= 0.001$. Cet effet apparaît dépendre de la durée d'exposition de l'animal au stress.

Le stress physique ne semble pas avoir d'effet sur le nombre des redressements dans le compartiment éclairé sauf lorsque l'exposition de l'animal au stress est assez longue (10j). Comme le montre la Fig. 30, le temps passé dans le compartiment clair a plutôt tendance à augmenter considérablement chez les animaux stressés à toutes les durées (1j, 4j et 10j) ; ANOVA à un facteur : $F(5, 29)= 3.695$; $p= 0.01$. Nous avons noté aussi que les animaux stressés pendant 4j et 10j successifs, passent moins de temps dans le compartiment obscure par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur : $F(5,28)=1.422$; $p=0.247$).

La Fig. 31 montre que l'activité locomotrice est peu affectée par le stress physique, elle augmente sensiblement chez les animaux stressés pendant 4j successifs (ANOVA à un facteur : $F(3,29)=2.992$; $p=0.047$). Cependant, l'activité locomotrice dans le compartiment obscure a légèrement diminué à toutes les durées du stress (ANOVA à un facteur : $F(3, 27)=3.014$; $p= 0.047$).

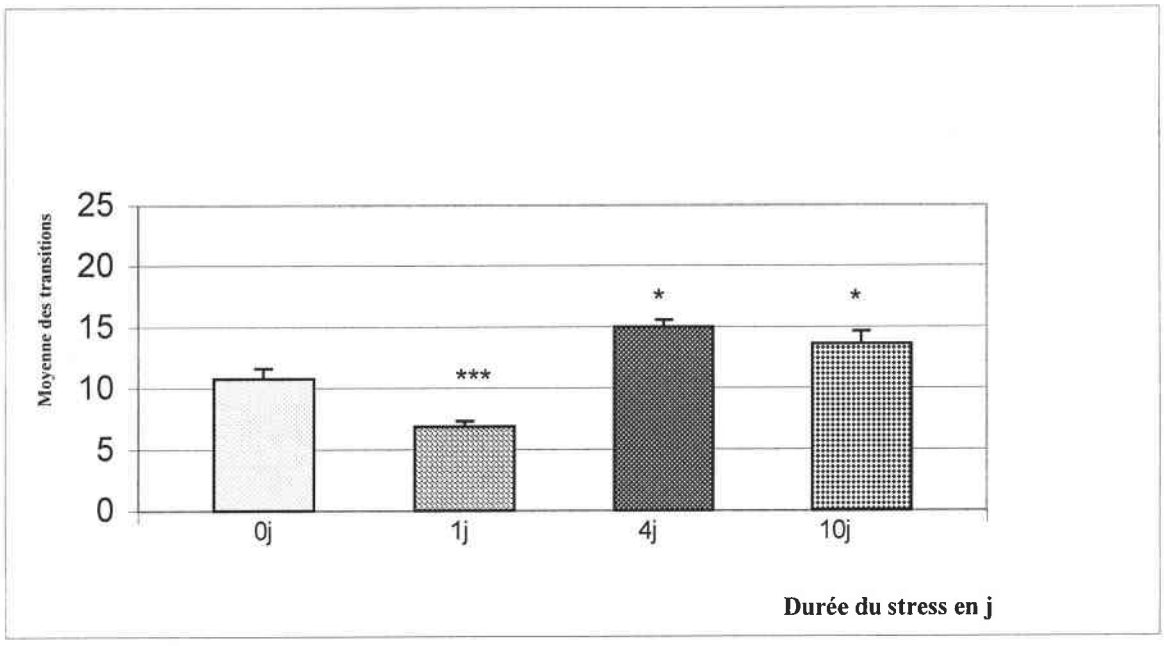


Fig. 28 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des transitions effectuées par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots.
*****: $p< 0.001$; *$p< 0.05$.**

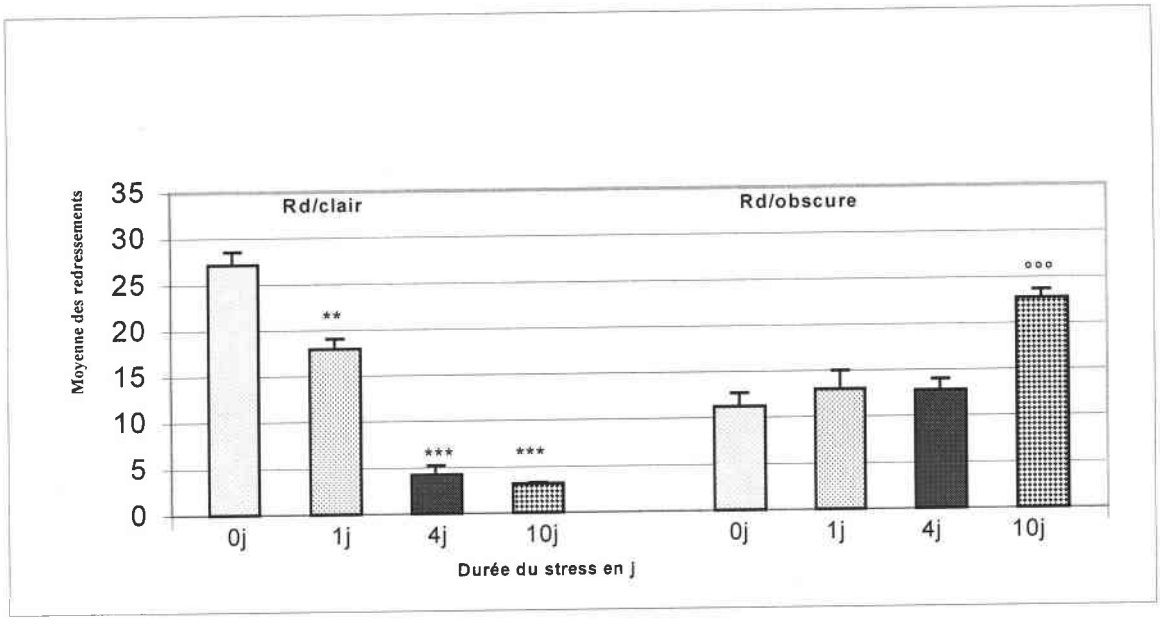


Fig. 29 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Rd: redressements. ***p<0.001, **: p< 0.01; °°°: p<0.001.

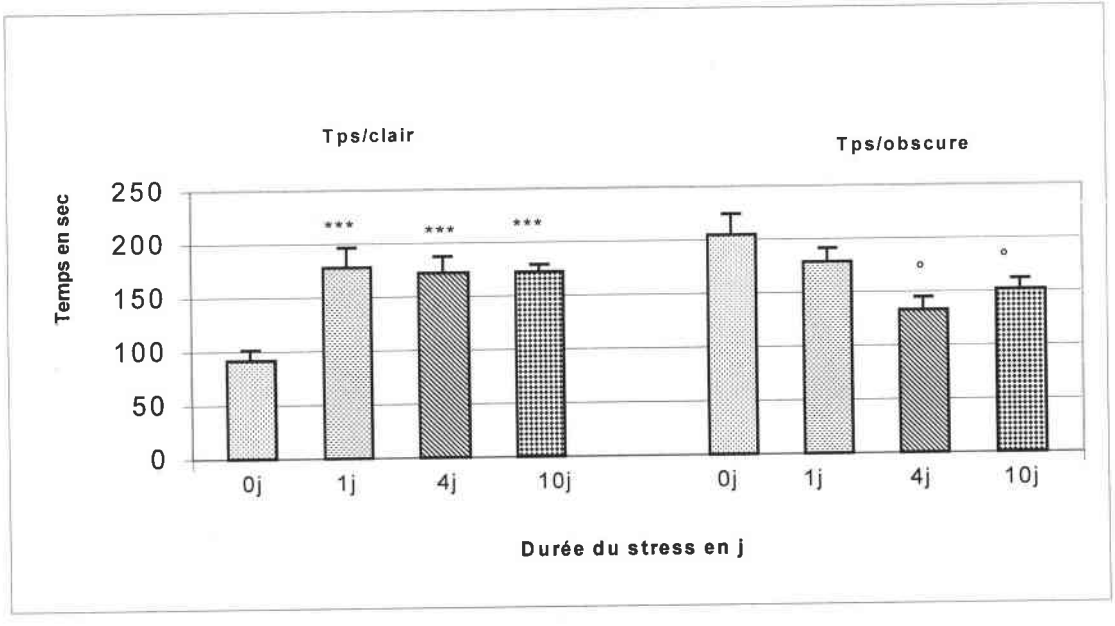


Fig. 30 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le temps passé par la souris dans les deux compartiments éclairé et obscure de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Tps: temps. ***: p<0.001; °: p<0.05.

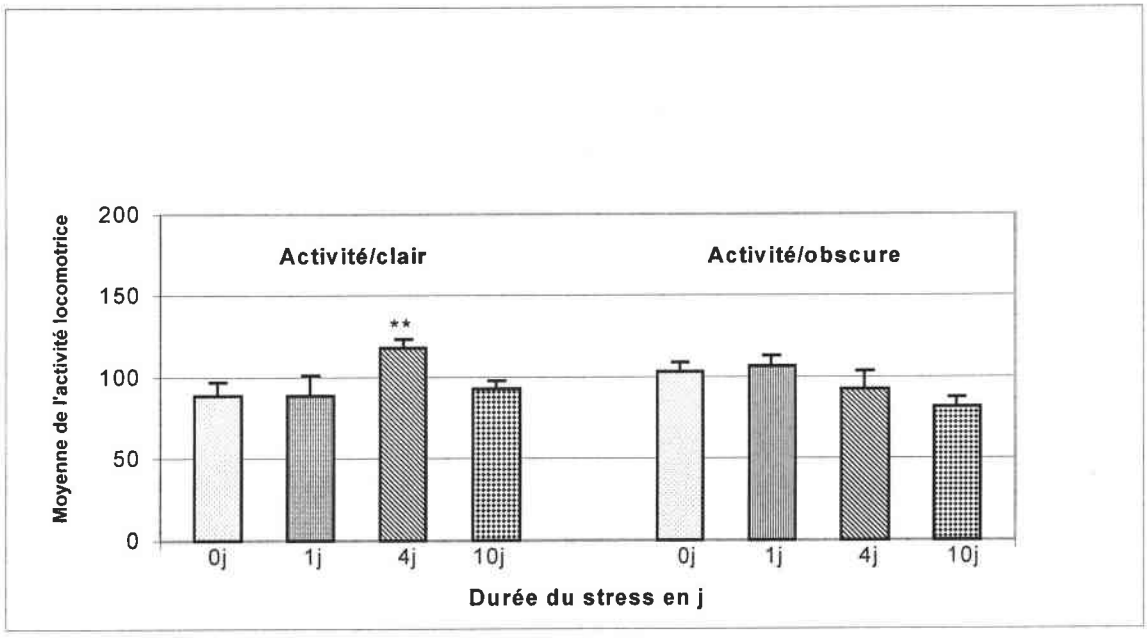


Fig. 31 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur l'activité locomotrice de la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. **:p< 0.01.

1-1-1-2. Stress psychosocial

Comme le montre la Fig. 32, l'isolement social diminue le nombre des transitions effectués de façon importante chez les animaux isolés pendant 1j et 15j successifs, alors qu'un isolement de 4j, n'affecte pas le nombre des transitions. On peut supposer que les animaux isolés pendant 4j successifs ont tendance à s'adapter au test utilisé. Alors que l'isolement des animaux pendant 15j successifs, engendre plutôt une diminution du nombre des transitions. Ce résultat laisserait supposer que 15 j successifs d'isolement, provoquent une inhibition comportementale (ANOVA à un facteur :F(5, 32)= 4.117; p=0.0053).

Comme le montre la Fig. 33, le nombre total des redressements effectués, diminue en fonction de la durée de l'application du stress. Cette diminution est très importante quand le stress psychosocial est appliquée 4j et 15j successifs par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur : F(5, 32)= 28.129 ; p= 0.0001). Ces résultats montrent que le stress psychosocial réduit encore davantage les redressements dans le compartiment clair chez les animaux stressés surtout à 4j et 15j d'application successive de stress d'isolement (ANOVA à un facteur : F(5, 32)= 1.70; p= 0.162).

Cependant le temps passé dans le compartiment clair augmente de façon significative chez les animaux isolés surtout à 4j et 15j successifs (ANOVA à un facteur : $F(5, 32)= 26.020$; $p= 0.0001$). Alors que le temps passé dans le compartiment obscure diminue à toutes les durées, surtout chez les animaux stressés 15j successifs (ANOVA à un facteur : $F(5, 30)= 1.698$, $p= 0.165$); Fig. 34. On pourrait expliquer cette augmentation du temps passé dans le compartiment clair par une inhibition comportementale induite par le stress ce qui a engendré une sorte d'immobilisation de l'animal dans le compartiment clair surtout qu'au niveau de la procédure expérimentale, l'animal est placé dans le test au niveau du compartiment éclairé. Par conséquent, sa tendance à diminuer son déplacement entraîne une augmentation du temps passé dans le compartiment clair et une diminution du temps passé dans le compartiment obscure.

Comme pour le stress physique, la Fig. 35 montre que l'isolement social n'affecte pas significativement l'activité locomotrice des animaux dans le compartiment clair (ANOVA à un facteur : $F(5, 32)= 1.472$, $p= 0.226$). Alors que l'activité locomotrice des animaux isolés pendant 15j successifs dans le compartiment obscure, est réduite de façon significative par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur: $F(5,30)=7.337$; $p= 0.0001$).

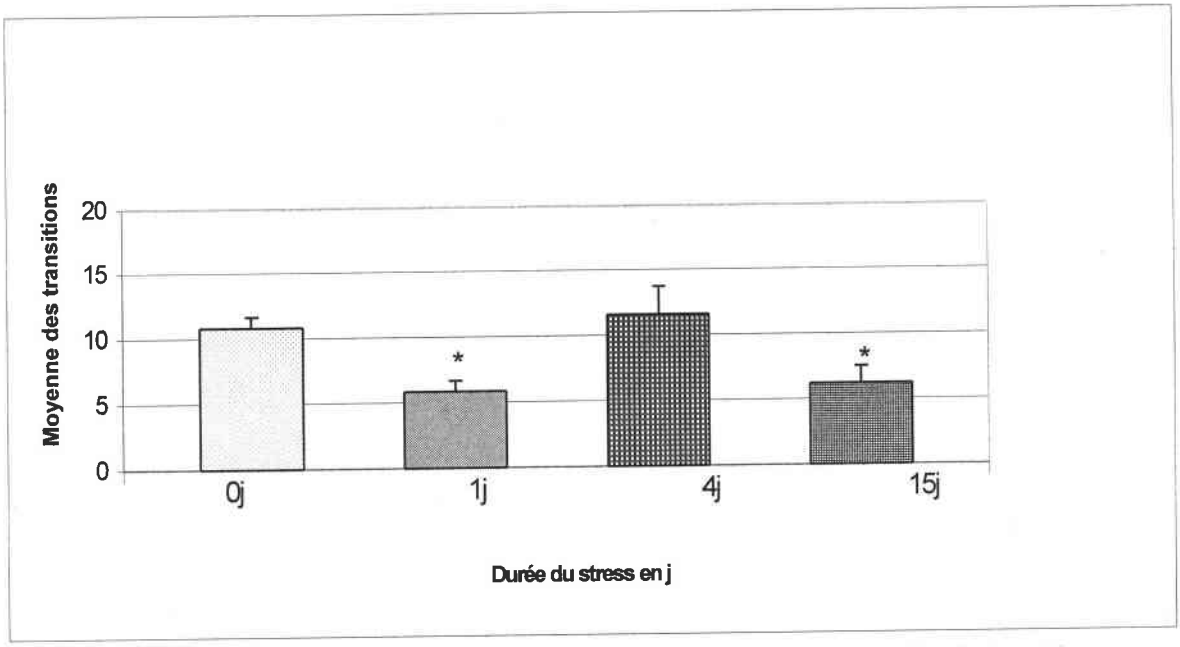


Fig. 32 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des transitions effectuées par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. *: p< 0.05.

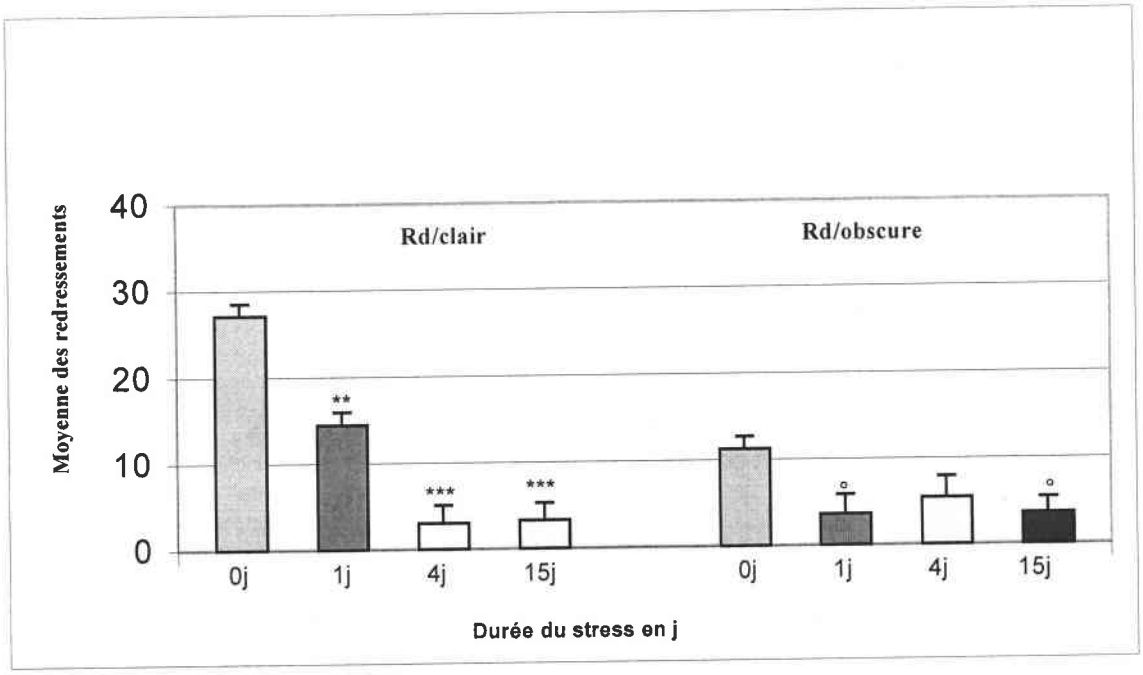


Fig. 33 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Rd: redressements. ***:p< 0.001; **: p<0.01; °: p< 0.05.

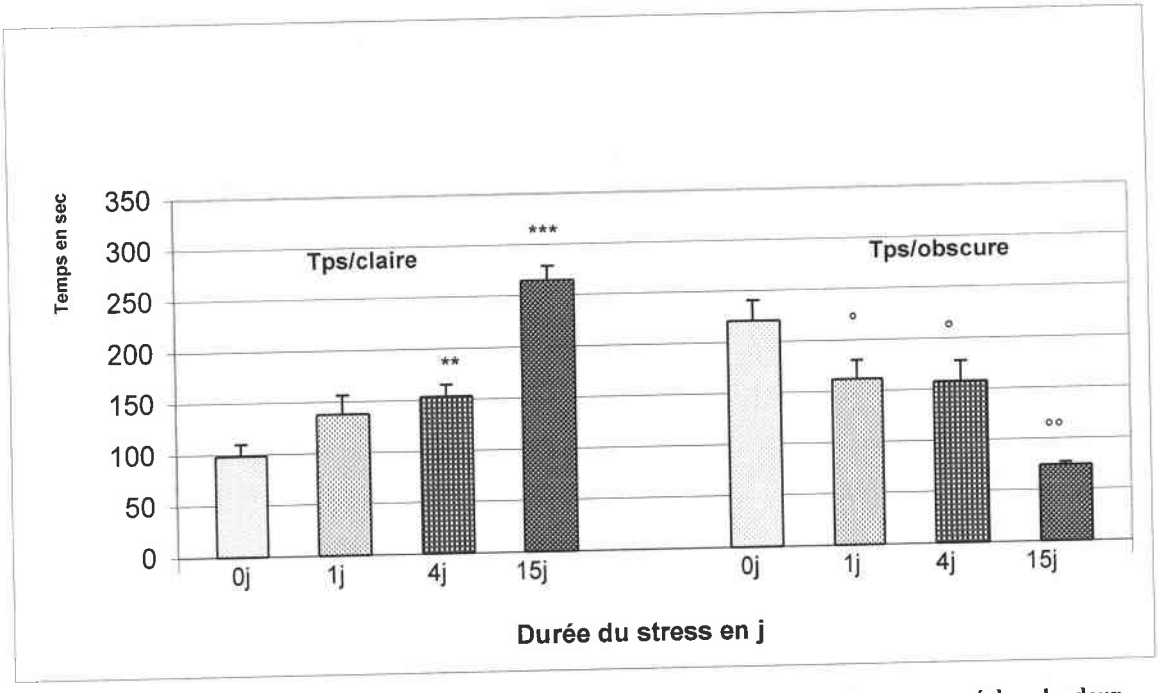


Fig. 34 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le temps passé dans les deux compartiments éclairé et obscure dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. Tps: temps. *** : p<0.001; **:p< 0.01; °°: p< 0.01; °: p< 0.05.

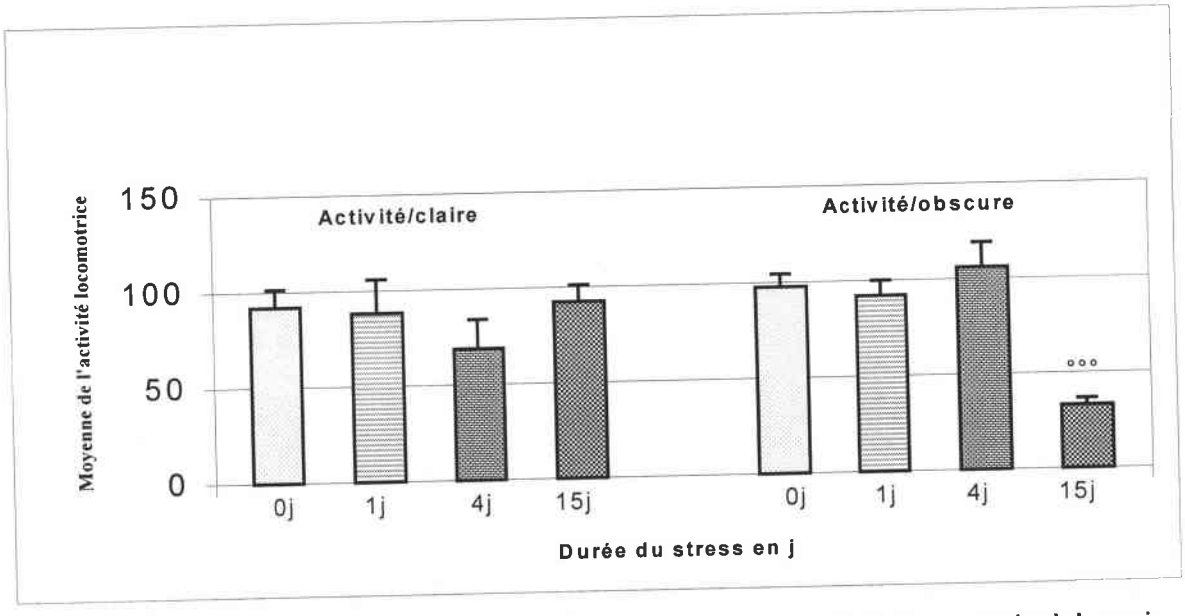


Fig. 35 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur l'activité locomotrice de la souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x4 lots. °°°: p<0.001.

1-1-2. Test de l'escalier

1-1-2-1. Stress physique

La Fig. 36 montre que le stress physique réduit le nombre des redressements effectués dans le test de l'escalier, particulièrement chez les animaux stressés pendant 1j et 10j successifs ($F(5, 37)= 4.03$; $p=0.0018$). Une réduction du nombre des marches montées a été montrée aussi chez les animaux stressés 1j et 10j successifs (Fig. 37) (ANOVA à un facteur: $F(5, 37)= 3.565$; $p= 0.009$). On pourrait expliquer la diminution des marches montées et des redressements par une réduction de l'activité locomotrice et exploratrice de l'animal suite à l'application du stress.

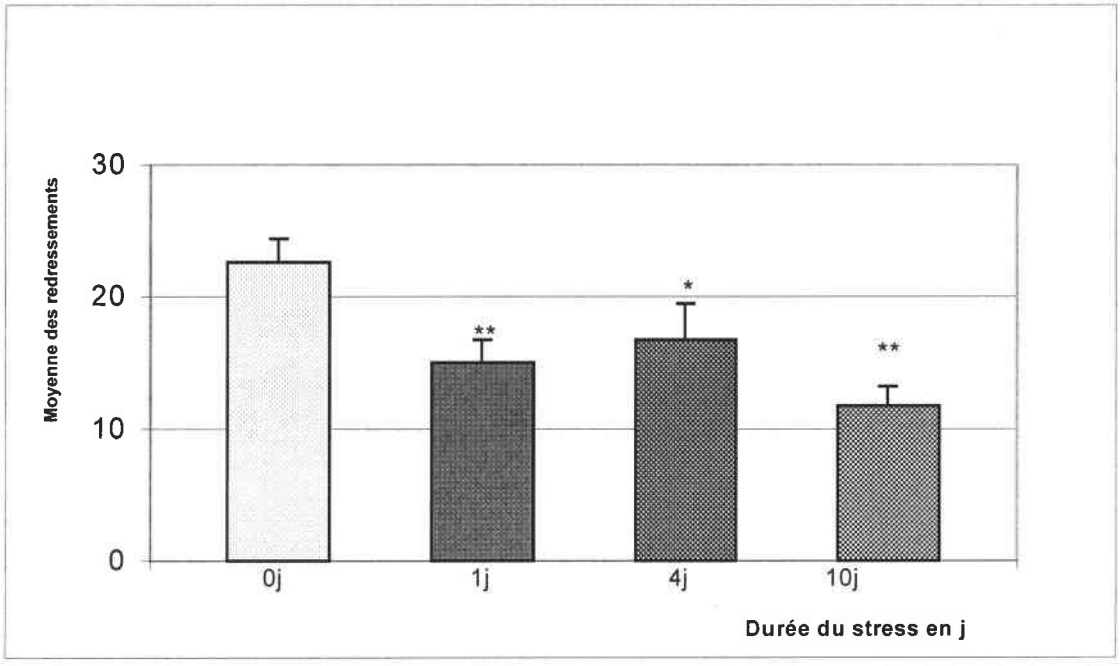


Fig. 36 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués dans le test de l'escalier. N=10x4 lots. **: p<0.01,*: p<0.05.

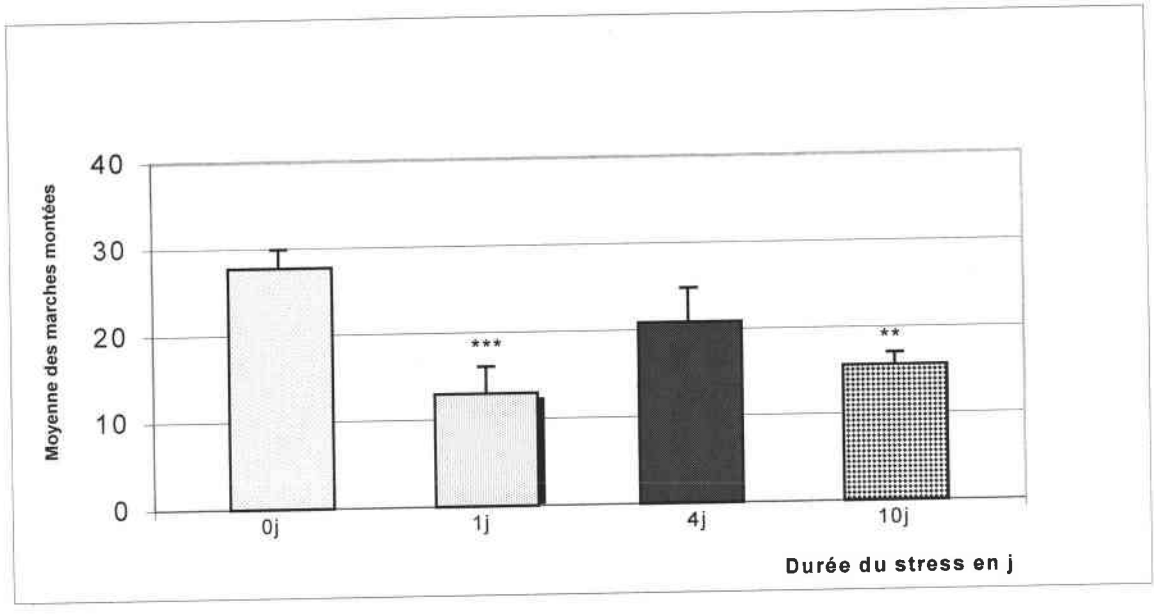


Fig. 37 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des marches montées dans le test de l'escalier chez la souris. N=10x4 lots. ***: p< 0.001, : p<0.01.**

1-1-2-2. Stress psychosocial

Comme le montre la Fig. 38, l'isolement des animaux pendant 4j et 15j successifs, entraînent une diminution du nombre des redressements effectués dans le test de l'escalier par rapport aux animaux non stressés, (ANOVA à un facteur : F(5, 40)= 13.748, p= 0.0001). De la même manière que les redressements (Fig. 39), l'isolement social réduit significativement le nombre des marches montées à toutes les durées de stress par rapport aux animaux non stressés, (ANOVA à un facteur : F(5, 40)= 13.509, p=0.0001). Ce test confirme la réduction de l'activité exploratoire et locomotrice observée chez les animaux soumis au stress physique.

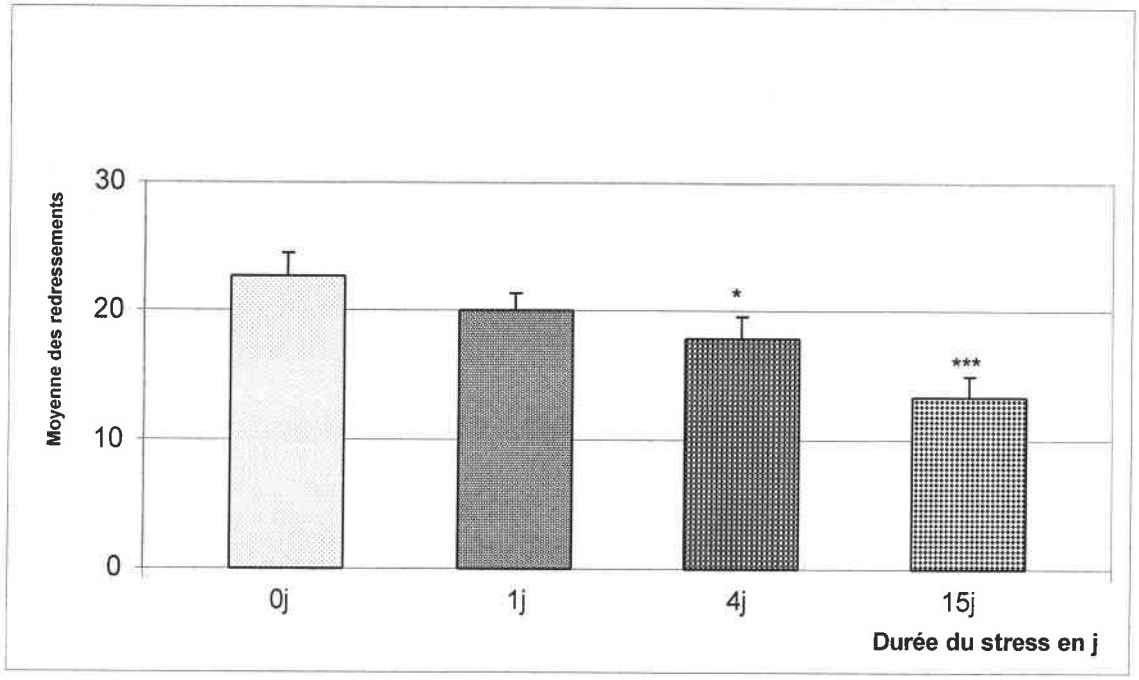


Fig. 38 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des redressements effectués par la souris dans le test de l'escalier. N=10x4 lots.
*****: p< 0.001, *: p<0.05.**

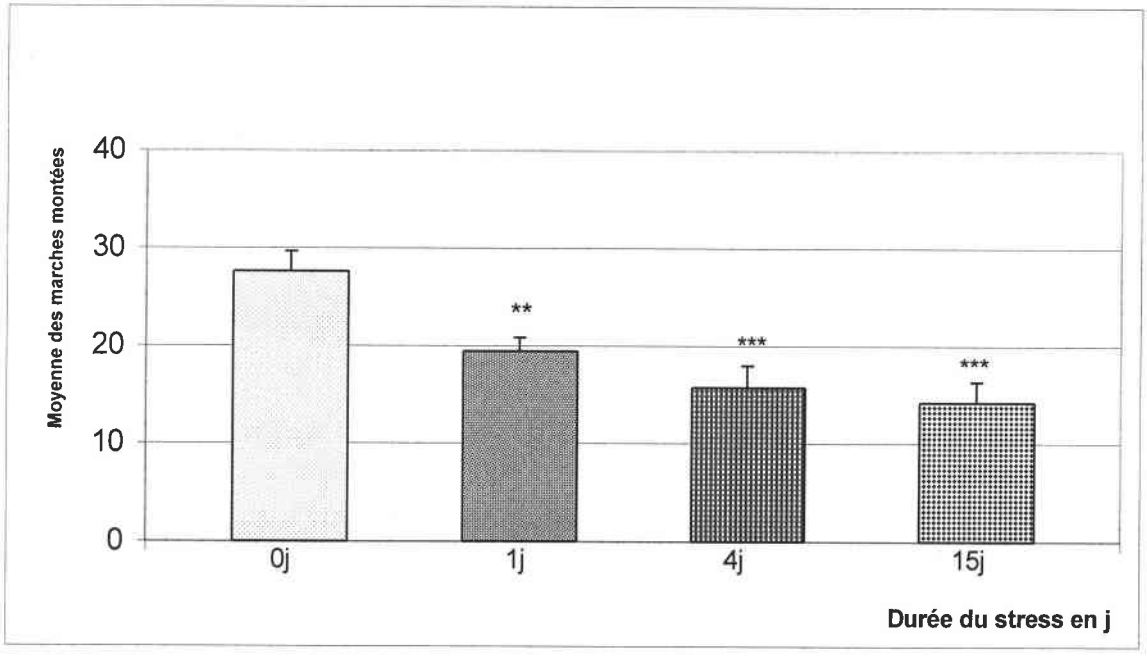


Fig. 39 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des marches montées effectuées dans le test de l'escalier. N=10x4 lots. ***: p<0.001, **: p<0.01.

2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur l'état des surrénales et celui de la muqueuse gastrique chez la souris.

2-1. La muqueuse gastrique

Comme le montre la photo. 4, le stress physique appliqué à court terme induit un phénomène d'inflammation au contact de la couche profonde de la muqueuse. On constate la présence de nombreux polynucléaires neutrophiles (indicateur de l'inflammation aiguë) autour des vaisseaux et au contact de la couche musculaire de l'estomac en comparaison à des animaux non stressés (Photo. 3). On retrouve chez les animaux stressés pendant 10j successifs, le même phénomène inflammatoire que celui observé chez les animaux stressés à court terme 1j (Photo. 5). Concernant les animaux isolés pendant 1j, on remarque une présence moins importante de polynucléaires neutrophiles comparés aux animaux exposés au stress physique pendant 1j (Photo. 6). On constate aussi que l'isolement pendant 15j successifs, n'induit pas un important phénomène inflammatoire en comparaison aux animaux exposés au stress physique pendant 10j consécutifs (Photo.7).

2-2. Les surrénales

Comme le montre la Photo. 9, la glande surrénale des animaux exposés au stress physique à court terme (1j), présente une dilatation vasculaire un peu marquée au niveau de la médullosurrénale avec une présence de quelques polynucléaires en comparaison aux surrénales des animaux non stressés (Photo. 8). On constate aussi au niveau du cortex une augmentation du nombre des vésicules de sécrétion des corticoïdes au niveau des cellules de la fasciculée et de la réticulée. De la même manière, le nombre des vésicules de sécrétion des catécholamines (la noradrénaline et l'adrénaline) a aussi augmenté au niveau des cellules chromaffines de la médullosurrénale. Lorsque le stress devient répétitif (stress physique pendant 10j

successifs), on constate une importante augmentation du nombre des vésicules de sécrétion des corticoïdes au niveau des cellules de la fasciculée et de la réticulée ainsi que celui des vésicules de sécrétion des catécholamines au niveau des cellules chromaffines (Photo. 10).

Cependant, les animaux isolés pendant 15j successifs (Photo.11), présentent une hypertrophie de la médullosurrénale due certainement à une importante augmentation du nombre des vésicules de sécrétion des catécholamines (l'adrénaline et la noradrénaline).

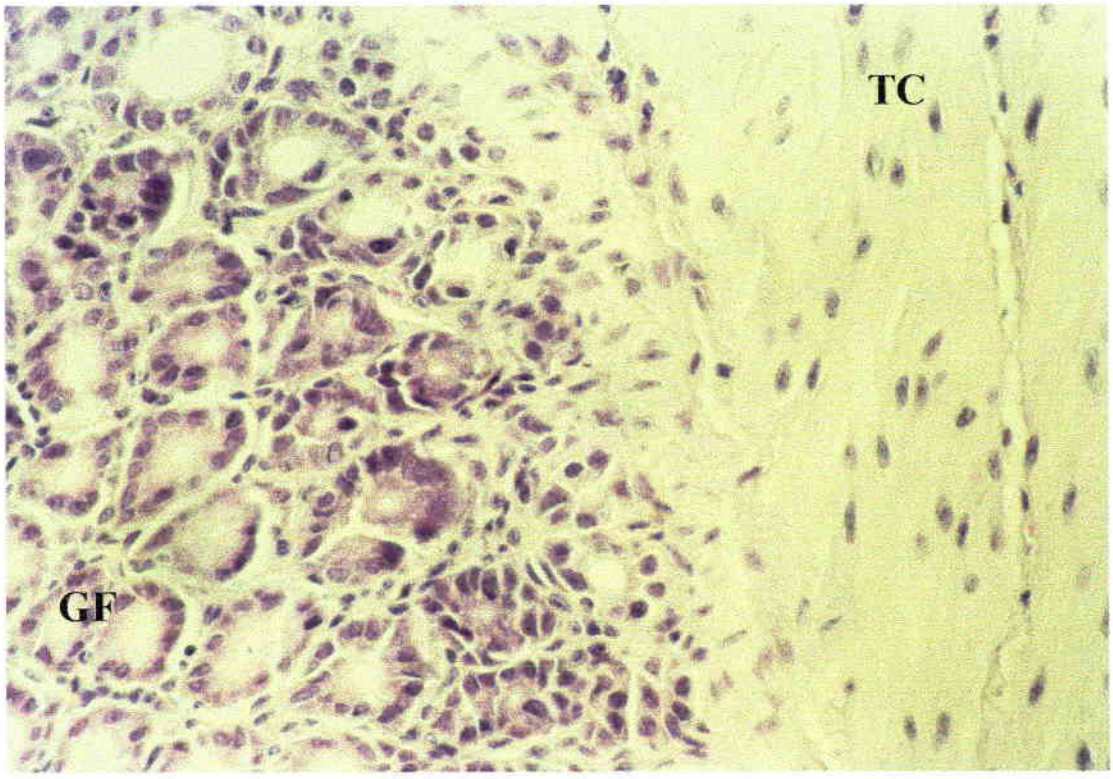


Photo.n°3. Coupe histologique d'un estomac d'une souris non stressée. (x 40). TC: tissu conjonctif . GF: glandes fundiques..

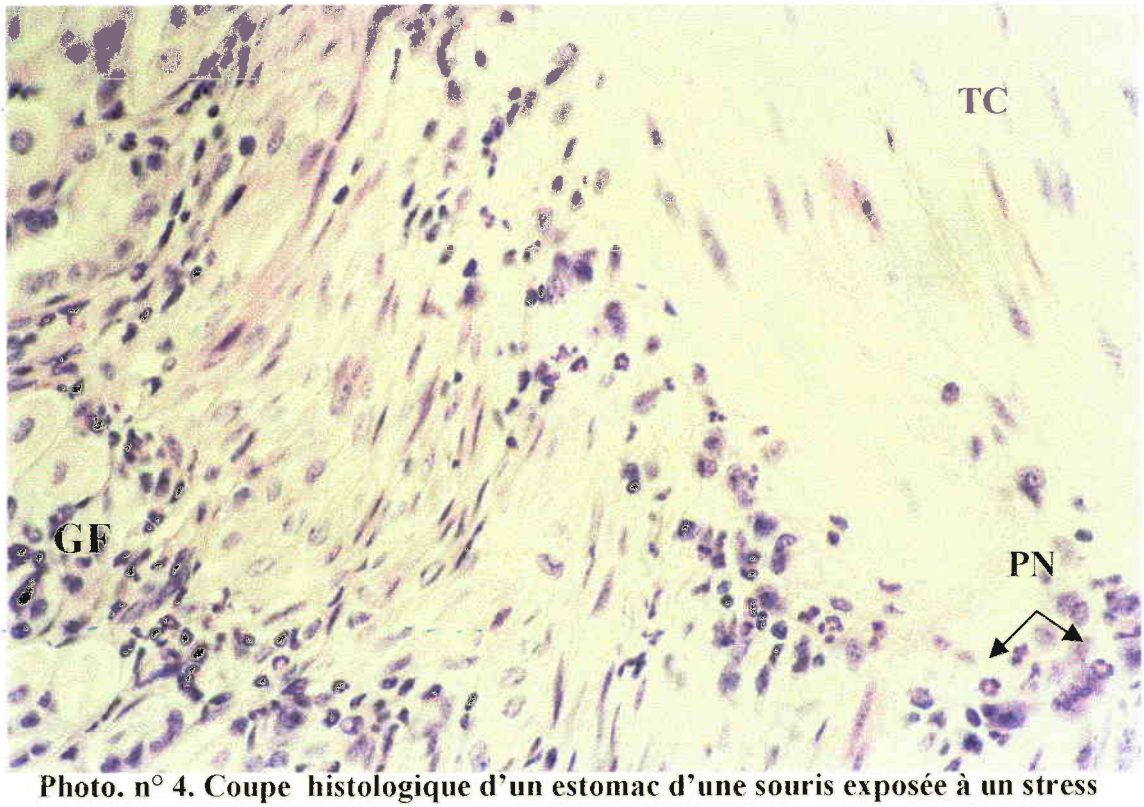


Photo. n° 4. Coupe histologique d'un estomac d'une souris exposée à un stress physique appliqué à court terme (1j). (X 40). PN: polynuclèaires neutrophiles. TC: tissu conjonctif. GF: glandes fundiques .

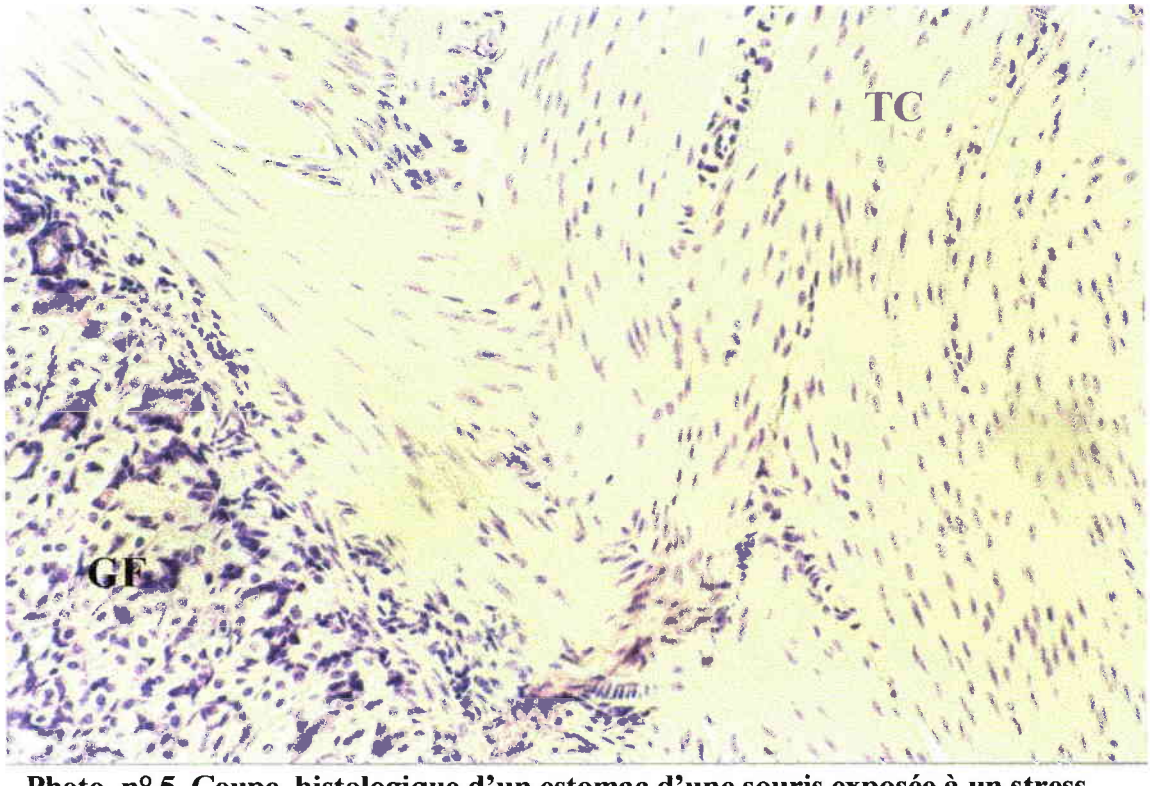


Photo. n° 5. Coupe histologique d'un estomac d'une souris exposée à un stress physique appliqué à long terme (10j). (X 20). TC: tissu conjonctif. GF: glandes fundiques.

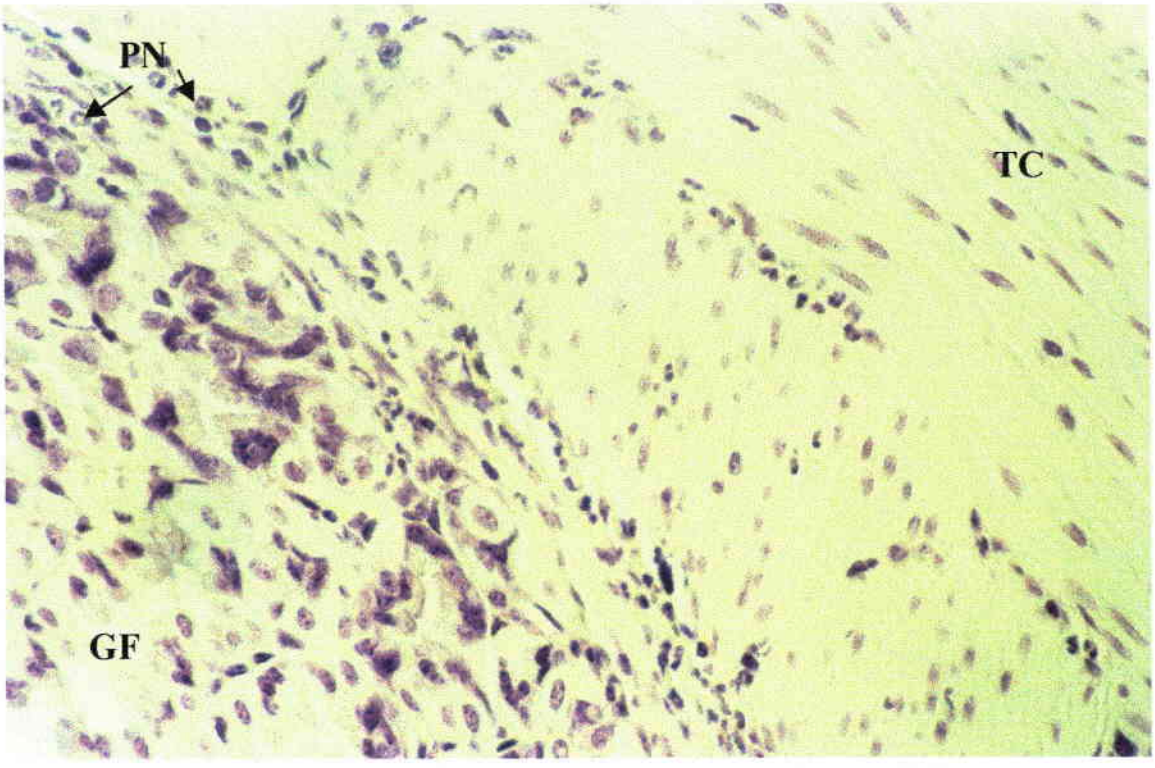


Photo.n° 6. Coupe histologique d'un estomac d'une souris exposée à un stress psychosocial appliqué à court terme (1 j). (x 40). TC: tissu conjonctif. GF: glandes fundiques. PN: polynucléaires neutrophiles.

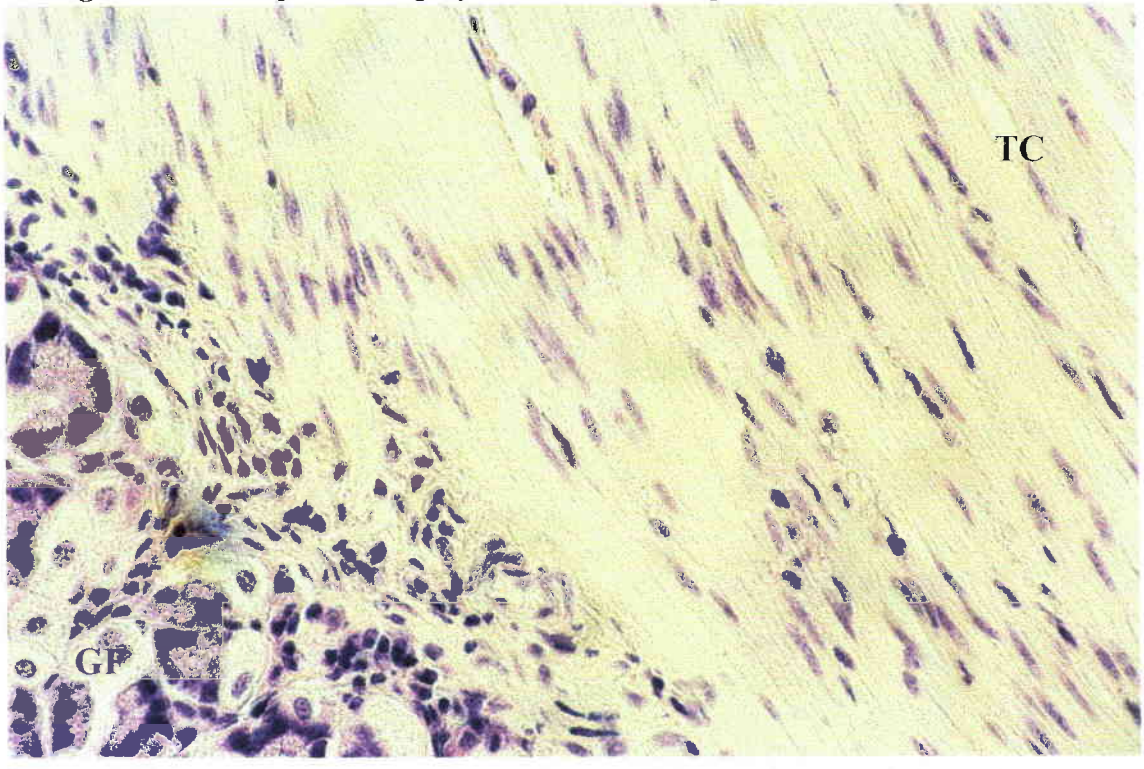


Photo.n° 7. Coupe histologique d'un estomac d'une souris exposée à un stress psychosocial appliqué à long terme (15 j). (x 40). TC: tissu conjonctif. GF: glandes fundiques.

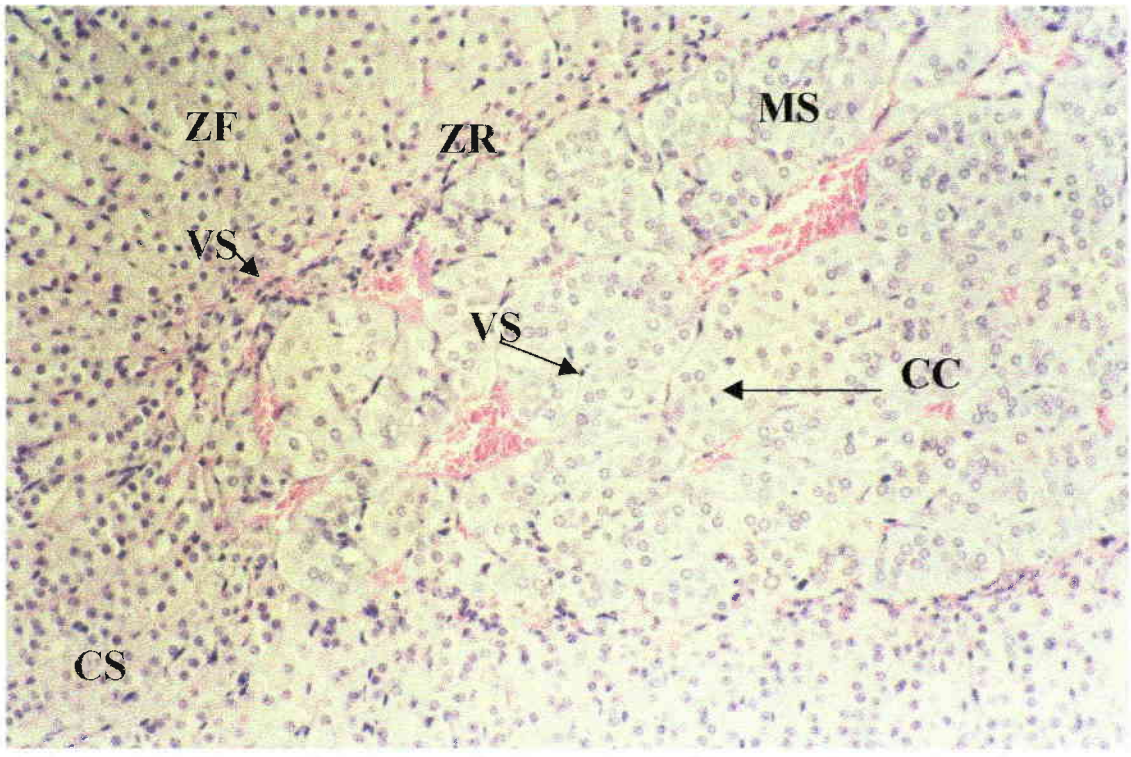


Photo. n° 8. Coupe histologique de la surrénale d'une souris non stressée. (x40). CS: cortex surrénalien; MS: médullosurrénalle. ZF: zone fasciculée; ZR: zone réticulée; CC: cellules chromaffines. VS: vésicules de sécrétion.

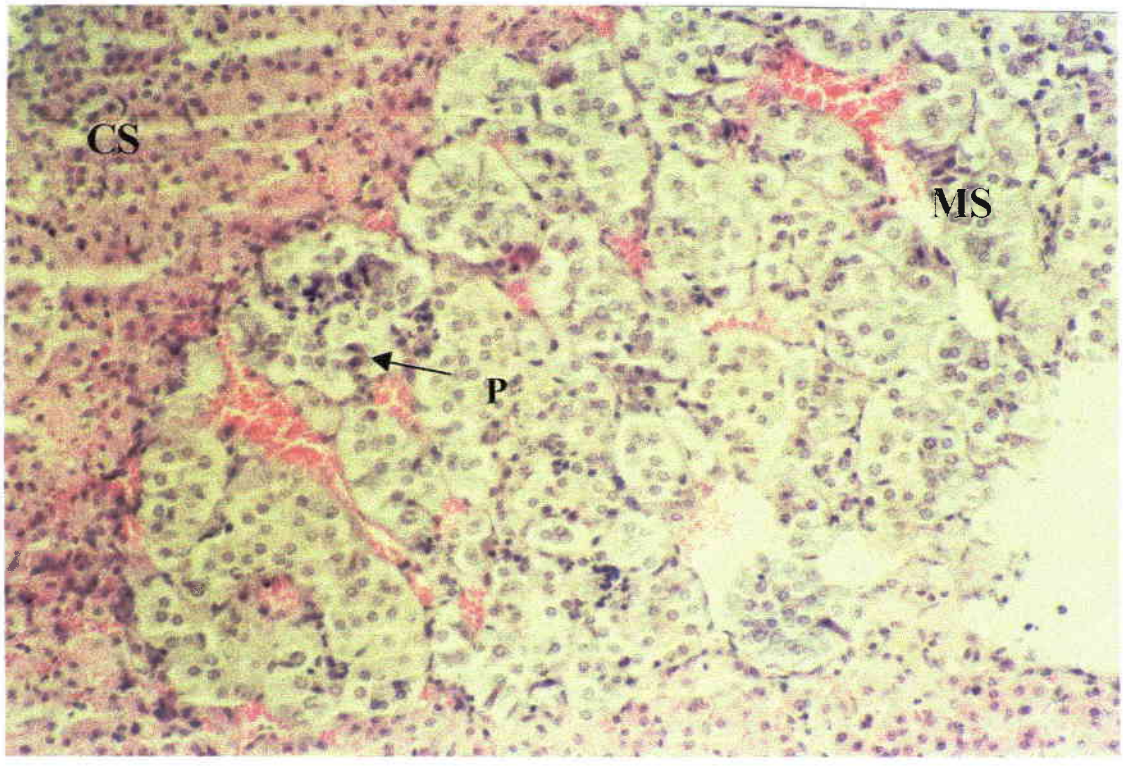


Photo. n° 9. Coupe histologique de la surrénale d'une souris exposée à un stress physique appliqué à court terme (1 j). (x40). CS: cortex surrénalien; MS: médullosurrénalien.; P: polynucléaires.

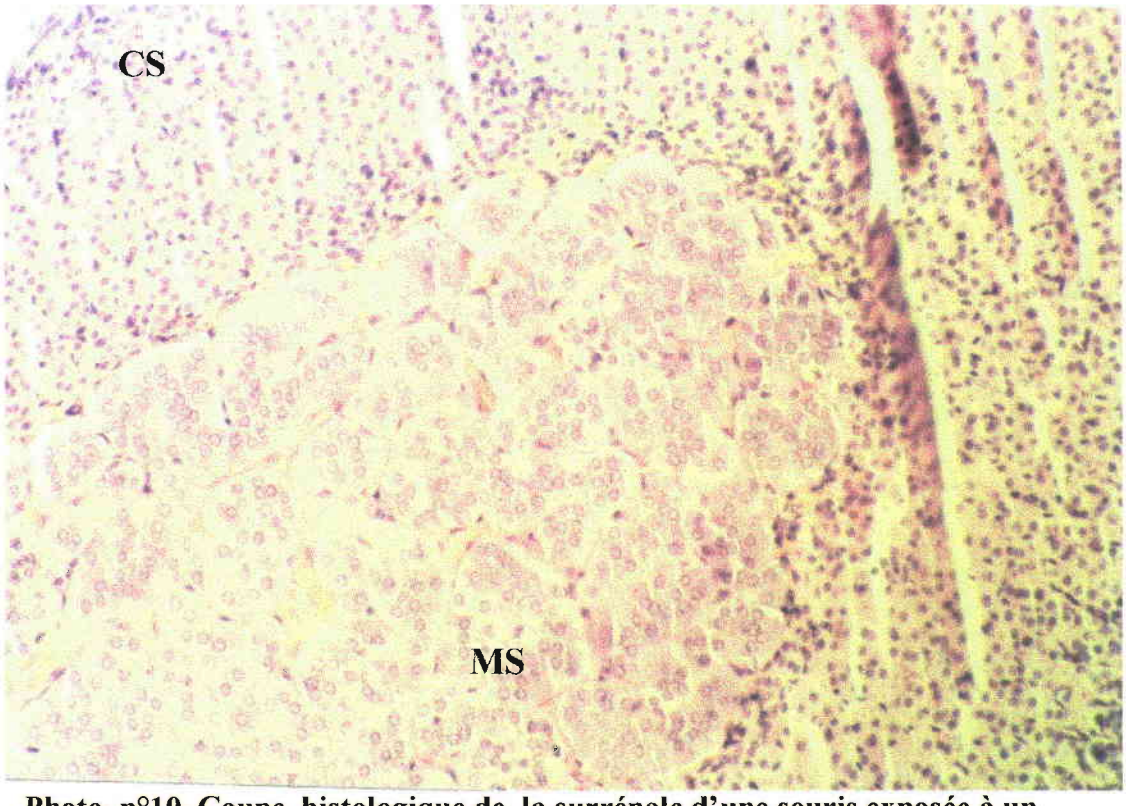


Photo. n°10. Coupe histologique de la surrénale d'une souris exposée à un stress physique appliqué à long terme (10 j). (x40). CS: cortex surrénalien; MS: médullosurrénalien.

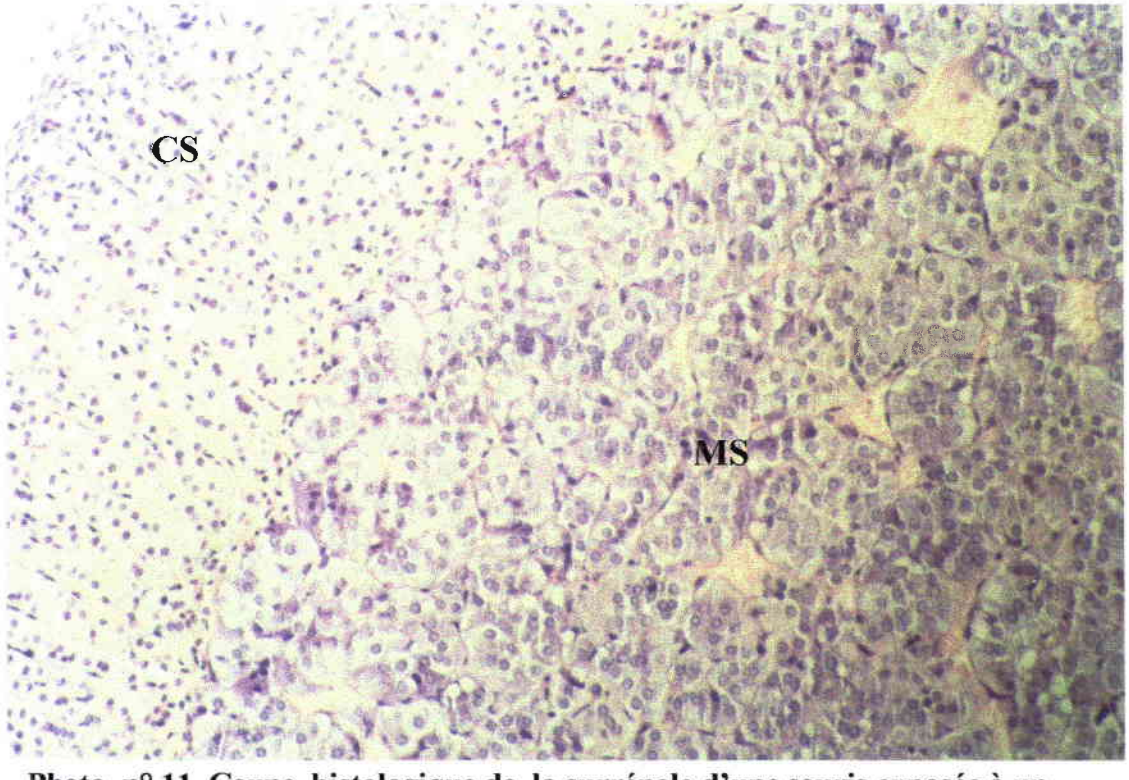


Photo. n° 11. Coupe histologique de la surrénale d'une souris exposée à un stress psychosocial appliqué à long terme (15 j). (x40). CS: cortex surrénalien; MS: médullosurrénalien.

3. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur l'immunité cellulaire de la souris.

3-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur le nombre des leucocytes.

3-1-1. Effets du stress physique sur la valeur absolue des leucocytes et sur d'autres paramètres sanguins.

Comme le montre le Tableau 12, le stress physique a un double effet sur le nombre des lymphocytes. Ce dernier diminue significativement quand le stress est appliqué à court terme (1j). Alors que le stress appliqué à long terme, a plutôt tendance à augmenter le nombre des lymphocytes en comparaison à des animaux non stressés.
Concernant les neutrophiles, leur nombre diminue particulièrement chez les animaux stressés à court terme 1j. Nous avons noté aussi que le stress physique appliqué pendant 1j et 10j, engendre une réduction du nombre des basophiles en comparaison à des animaux non stressés. Les monocytes diminuent de façon importante chez les animaux stressés pendant 4j et 10j successifs. Cependant, le nombre des éosinophiles augmente significativement à toutes les durées du stress et particulièrement quand le stress est appliqué à court terme (1j).

Tableau 12. Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des leucocytes chez la souris.

Nombre des cellules en $10^3/\mu l$	INS	IS 1j	IS 4j	IS 10j
Lym Moy ± SEM p	3.824 ± 0.296 ///	1.730 ± 0.213 p=0.007	3.840 ± 0.694 p= 0.831	5.329 ± 0.642 p=0.003
ANOVA à un facteur	**Effet du stress** F(2.22)= 3.429; p= 0.032			
Neut Moy ± SEM p	1.875 ± 0.407 ///	0.901 ± 0.281 p=0.019	1.536 ± 0.200 p= 0.547	1.557 ± 0.632 p=0.850
ANOVA à un facteur	**Effet du stress** F(2.16)= 0.271, p= 0.766			
Bas Moy ± SEM p	0.283 ± 0.062 ///	0.023 ± 0.021 p=0.001	0.162 ± 0.036 p= 0.379	0.143 ± 0.127 p=0.0001
ANOVA à un facteur	**Effet du stress** F(2.16)= 0.748, p= 0.488			
Mon Moy ± SEM p	2.340 ± 0.231 ///	1.950 ± 0.121 p=0.258	1.700 ± 0.203 p= 0.042	0.686 ± 0.187 p=0.003
ANOVA à un facteur	**Effet du stress** F(2.16)= 12.187 ; p= 0.007			
Eos Moy ± SEM p	0.040 ± 0.003 ///	1.052 ± 0.172 p=0.0001	0.588 ± 0.152 p=0.003	0.143 ± 0.061 p=0.006
ANOVA à un facteur	**Effet du stress** F(2,16)= 12.095; p= 0.0007			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés ; Lym : lymphocytes, Neut : neutrophiles, Bas : basophiles, Mon : monocytes, Eos : éosinophiles. N=9x4 lots. $p< 0.05$ est considéré significatif.

Concernant les paramètres sanguins (Tableau. 13), le stress physique affecte significativement le nombre des globules rouges quand le stress est répétitif (4j successifs). Le taux d'hématocrite a tendance à diminuer à toutes les durées de stress. Cependant le nombre des plaquettes a plutôt tendance à augmenter quand le stress est répétitif (4j et 10j successifs). Le volume globulaire moyen n'est pas affecté par ce type de stress.

Tableau 13. Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur les paramètres sanguins chez la souris.

	INS	IS		
		1j	4j	10j
***RBC* $10^6/\mu l$** Moy ± SEM P	8.460 ± 0.191 ///	7.263 ± 0.505 p=0.120	4.425 ± 0.940 p= 0.001	6.799 ± 0.428 p=0.128
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(2,22)= 8.287 ; p=0.025			
VCM fl Moy ± SEM P	51.200 ± 0.785 ///	48.567 ± 0.650 p=0.020	51.088 ± 0.403 p= 0.923	52.171 ± 0.921 p=0.160
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(3, 21)= 4.643 ; p= 0.012			
HCT % Moy ± SEM P	43.360 ± 1.086 ///	35.417 ± 2.695 p=0.030	36.712 ± 3.230 p=0.040	35.357 ± 2.058 p=0.024
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(3.21)= 3.697 ; p= 0.032			
Plqts $10^3/\mu l$ Moy ± SEM P	483.500 ± 108.391 ///	646.167 ± 28.866 p=0.170	722.200 ± 32.250 p= 0.2500	825.000 ± 70.500 p=0.145
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(3.13)= 5.253 ; p= 0.013			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés. RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen ;
HCT : hématocrite ; Plqt : les plaquettes. N=9x4 lots. $p< 0.05$ est considérée significatif.

3-1-2. Effets du stress psychosocial sur la valeur absolue des leucocytes et sur d'autres paramètres sanguins.

On constate que le stress psychosocial affecte de la même manière que le stress physique, le nombre des lymphocytes en le réduisant quand le stress est appliqué une fois et en l'augmentant quand il est appliqué de façon répétitive (4j successifs) en comparaison aux animaux non stressés. Concernant le nombre des basophiles et des monocytes, on constate que l'isolement social réduit de façon très importante leur nombre quand le stress est appliqué 1j.

Cependant, le nombre des éosinophiles augmente significativement chez les animaux stressés pendant 4j et 15j successifs par rapport aux animaux non stressés. Aucune variation statistiquement significative, n'a été montrée au niveau du nombre des neutrophiles chez les animaux stressés (Tableau 14).

Concernant les paramètres sanguins, le Tableau. 15 montre que le nombre des globules rouges et le taux d'hématocrite diminuent significativement quand le stress est répétitif (4j et 15j successifs). Cependant, le nombre des plaquettes a plutôt tendance à augmenter quand le stress est répétitif 4j et 15j consécutifs. Comme pour le stress physique, le volume globulaire moyen des cellules n'a pas été affecté par l'isolement social.

Tableau 14. Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des leucocytes chez la souris.

Nombre des cellules $10^3/\mu l$	INS	IS		
		1j	4j	15j
Lym				
Moy	3.824	1.864	7.317	4.750
±	±	±	±	±
SEM	0.296	0.222	0.566	0.391
p	///	p=0.0006	p=0.0001	p=0.050
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,36)=20.768 ; p=0.0001			
Neut				
Moy	1.857	1.767	2.180	2.017
±	±	±	±	±
SEM	0.407	0.209	0.400	0.334
p	///	p=0.99	p=0.734	p=0.859
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,30)= 2.838 ; p=0.032			
Bas				
Moy	0.283	0.000	0.033	0.280
±	±	±	±	±
SEM	0.062	0.000	0.021	0.280
p	///	p=0.036	p=0.280	p=0.940
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,31)= 1.909 ; p= 0.121			
Mon				
Moy	2.340	1.150	2.000	1.100
±	±	±	±	±
SEM	0.231	0.167	0.761	0.134
p	///	p=0.039	p=0.768	p=0.050
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5, 31)= 1.718 ; P= 0.159.			
Eos				
Moy	0.040	0.100	0.120	0.160
±	±	±	±	±
SEM	0.003	0.046	0.031	0.040
p	///	p=0.07	p=0.159	p=0.011
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,31)=1.611 ; p=0.186.			

INS: Immunisés non stressés.
IS: Immunisés stressés.
Lym: lymphocytes; Neut : neutrophiles ; Bas : basophiles ; Mon : monocytes ;
Eos: éosinophiles. N=9x4 lots. $p< 0.05$ est considérée significatif.

Tableau. 15 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur les paramètres sanguins chez la souris.

	INS	IS		
		1j	4 j	15 j
RBC $10^6/\mu l$ Moy ± SEM p	8.460 ± 0.191 ///	8.906 ± 0.206 p= 0.214	7.444 ± 0.178 p=0.006	7.607 ± 0.118 p= 0.030
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,34)= 16.041 ; p= 0.0001.			
VCM fl Moy ± SEM p	51.200 ± 0.785 ///	49.725 ± 0.920 p=0.483	49.033 ± 0.674 p=0.779	50.613 ± 0.486 p=0.334
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,34)=1.336 ; p= 0.273.			
HCT % Moy ± SEM p	43.360 ± 1.086 ///	43.450 ± 1.463 p=0.395	38.433 ± 0.765 p=0.007	37.675 ± 0.657 p=0.004
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5,34)= 5.108; p=0.0013			
Plqts $10^3/\mu l$ Moy ± SEM p	483.500 ± 108.391 ///	609.333 ± 70.817 p=0.05	718.000 ± 63.417 p=0.002	742.625 ± 26.288 p=0.001
ANOVA à un facteur	***Effet du stress*** F(5, 30)=6.773; p=0.0002.			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen; HCT : hématocrite ;
Plqt : les plaquettes. N=9x4 lots. $p< 0.05$ est considéré significatif.

3-2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4), celui des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8) et celui des cellules tueuses naturelles périphériques (NK).

3-2-1. Stress physique

La comparaison des groupes non immunisés non stressés (NINS) aux immunisés non stressés (INS) s'est révélée significative uniquement pour la catégorie des lymphocytes TCD4 ($p<0.001$) ; pour les autres catégories, il n'y' a aucune variation significative. Chez les animaux non immunisés (NINS et non immunisés stressés « NIS »), la comparaison fait apparaître une différence significative aussi bien pour les lymphocytes TCD4 que pour les cellules NK. La catégorie des cellules T CD4 semble diminuer après le stress chez les NIS, par contre les catégories des cellules NK semblent plutôt augmenter chez les NIS.

Lorsqu'on observe les effets conjoints de l'immunisation et du stress, comme le montre la Fig. 40 une diminution statistiquement significative ($p< 0.001$) du nombre des TCD4 sous l'effet du stress et de l'immunisation, alors que la catégorie des cellules NK apparaît augmenter sensiblement ($p< 0.01$). Ces comparaisons nous permettent donc de porter nos études comparatives pour la suite de notre travail entre les INS et les IS dans le but d'étudier les activités pharmacologiques (réponses optimales) des drogues et des molécules utilisées ultérieurement dans ce travail.

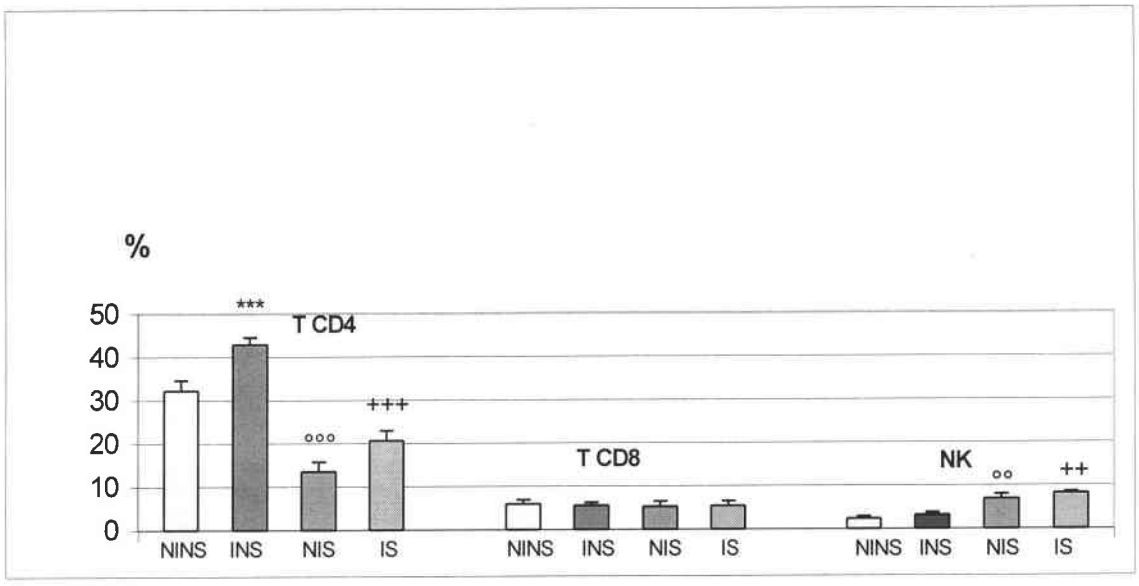


Fig. 40 Effet de l'immunisation sur l'immunité cellulaire chez la souris. N=9-10/x4 lots. NINS: non immunisés non stressés, INS: immunisés non stressés. NIS: non immunisés stressés, IS: immunisés stressés. *: NINS/INS; °:NINS/NIS; +:INS/IS.

Les résultats de la Fig. 41 montrent que le stress physique appliqué 1j ou plusieurs jours successifs, engendre une diminution significative du nombre des lymphocytes auxiliaires T CD4 par rapport aux animaux non stressés. Cependant, une application de stress physique pendant 4j successifs n'affecte pas le nombre des cellules T CD4 par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur : $F(5, 38)= 27.111$; $p= 0.0001$).

On pourrait expliquer la tendance de la réponse des cellules TCD4 par une adaptation des animaux à ce type de stress quand il est appliqué pendant 4j successifs avec un épuisement de cette phase de résistance à 10j de stress successifs qui entraîne une diminution du nombre des cellules T CD4, même si cette diminution reste moins importante que celle engendrée par le stress à court terme (1j).

La Fig. 42 montre que le stress physique n'affecte pas le nombre des cellules cytotoxiques/suppressives à toutes les durées du stress (ANOVA à un facteur: $F(5, 38)= 27.081$; $p= 0.05$).

Cependant, la Fig. 43 montre que le nombre des cellules NK augmente à toutes les durées de stress, cette augmentation est particulièrement importante à 1j et à 10j de stress. Alors que 4j successifs de stress, engendrent une légère augmentation du nombre des cellules NK par rapport aux animaux non stressés (ANOVA à un facteur : F(6, 40)= 10.543; p= 0.0001).

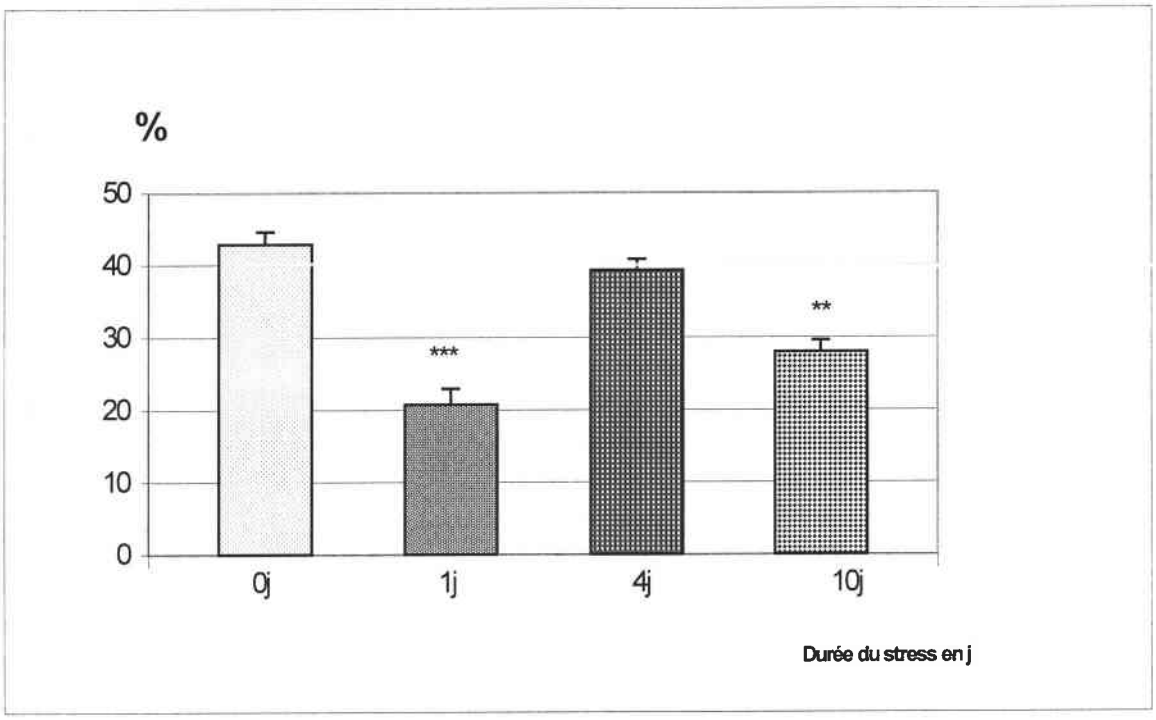


Fig. 41 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes auxiliaires TCD4 chez la souris. N=9-10/x4 lots.
NS : non stressés; S: stressés. ***: p<0.001, **: p<0.01.

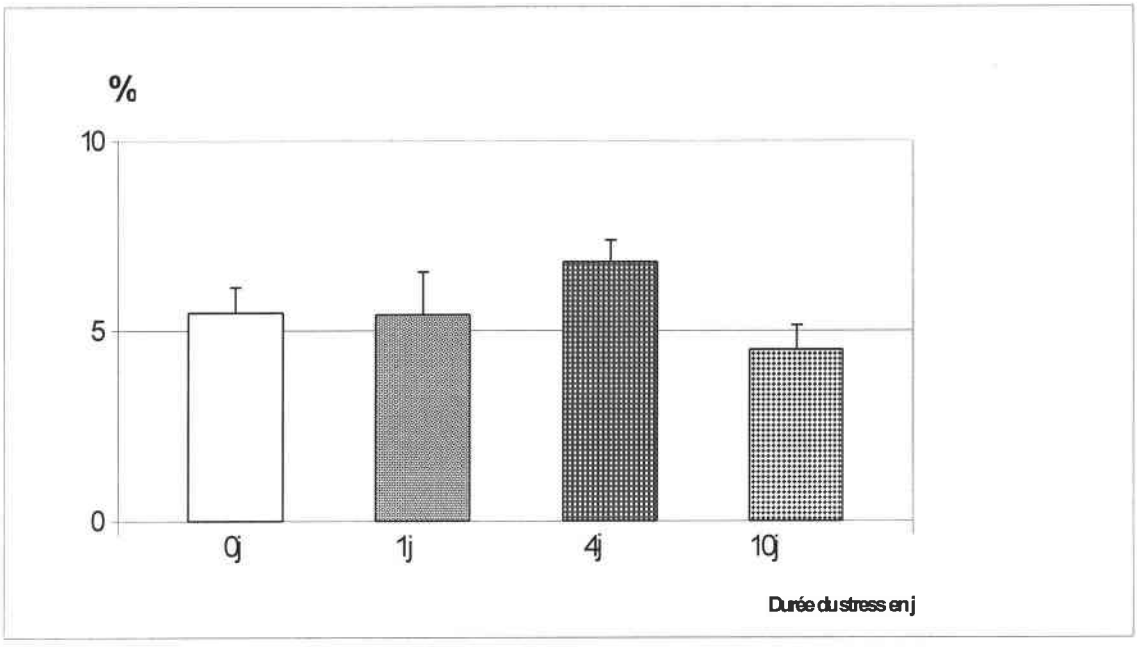


Fig. 42 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes cytotoxiques/suppresseurs TCD8 chez la souris. N=9-10/x4 lots.

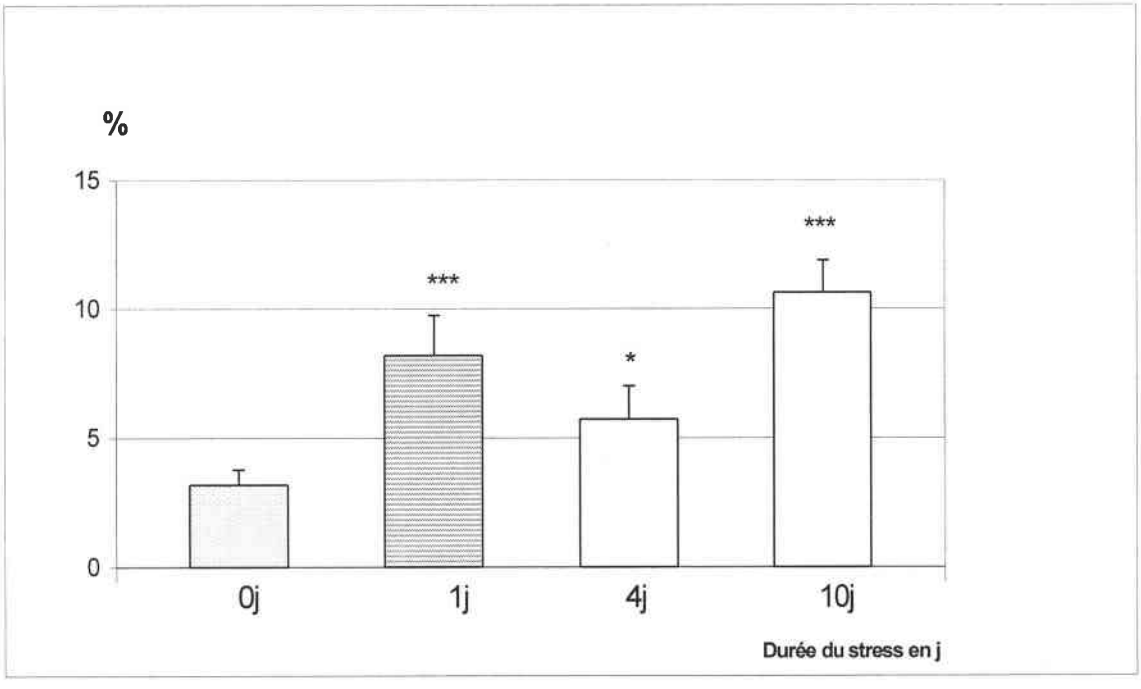


Fig. 43 Effet du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des cellules tueuses naturelles NK chez la souris. N=9-10/x4 lots. ***: p< 0.001; *: p< 0.05.

3-2-2. Stress psychosocial.

La Fig. 44 a montré que le stress psychosocial diminue de façon significative le nombre des cellules TCD4 chez les animaux isolés à toutes les durées de stress étudiées et de façon importante à 1j (ANOVA à un facteur : F(3, 39)= 5.606; p= 0.0006).

Comme pour le stress physique, l'isolement social n'affecte pas le nombre des lymphocytes T CD8 par rapport aux animaux non stressés (Fig. 45); ANOVA à un facteur : F(5, 38)= 0.306 ; p= 0.906.

Comme le montre la Fig. 46, le stress social augmente de façon importante le nombre des cellules tueuses surtout, à 1j et à 4j successifs d'isolement. Par contre à 15j d'isolement, on a tendance à supposer que l'isolement répétitif entraîne une certaine adaptation de l'animal au stress. On pourrait supposer que l'animal arrive à stabiliser le taux des cellules NK après l'exposition à 15j successifs d'isolement en comparaison à des animaux non stressés (ANOVA à un facteur : F(5, 39)= 3.571; p= 0.010).

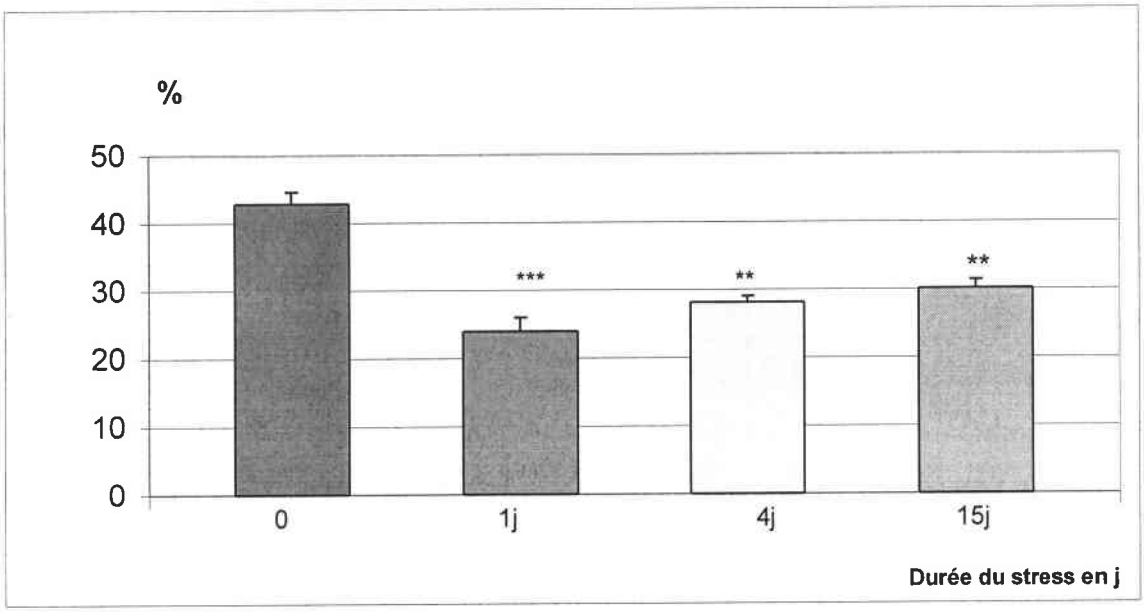


Fig. 44 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes auxiliaires TCD4 chez la souris. N=9x4 lots. ***: p< 0.001,:p<0.01.**

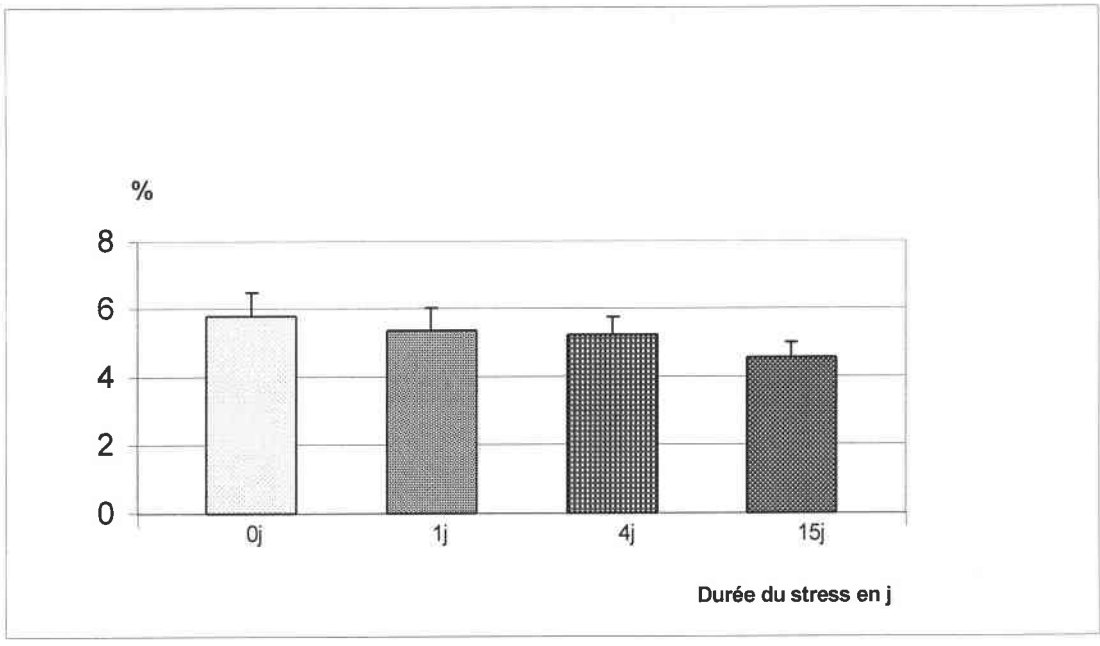


Fig. 45 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des lymphocytes cytotoxiques/suppresseurs TCD8 chez la souris. N=9x4 lots.

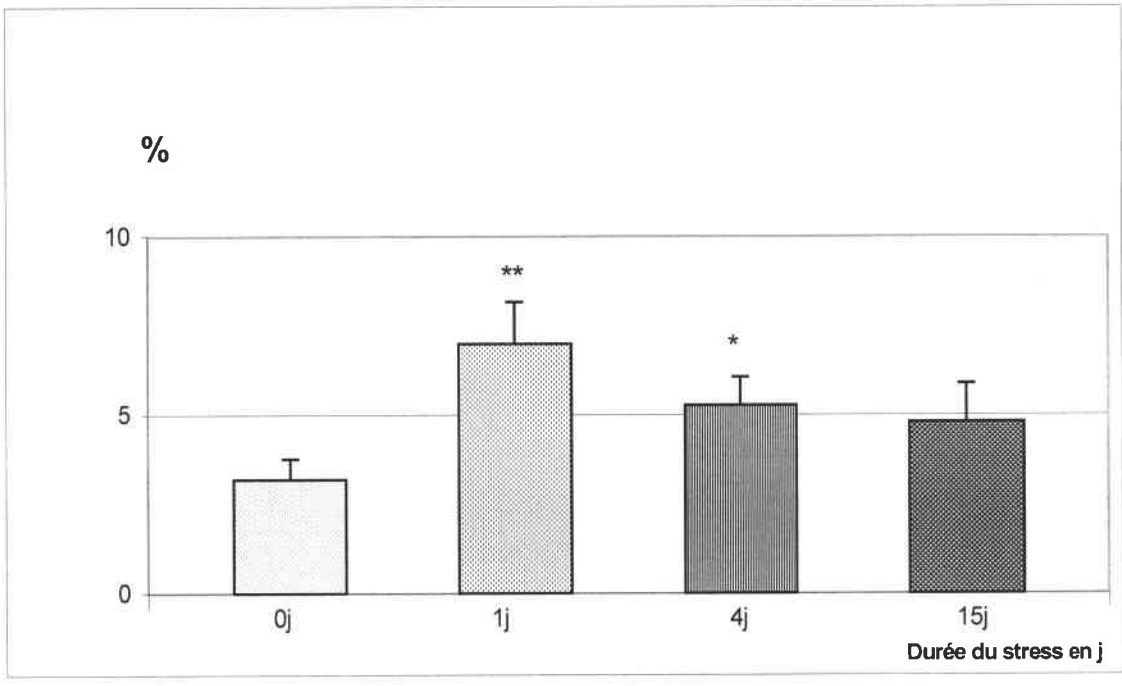


Fig. 46 Effet du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur le nombre des cellules tueuses naturelles NK chez la souris. N=9x4 lots. **: p< 0.01, *: p< 0.05.

4. Les effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme et à long terme sur la réponse endocrinienne chez la souris.

Dans le but de mieux comprendre les effets du stress sur le taux plasmatique de certaines hormones dites de stress (corticostérone, adrénaline et noradrénaline). Nous avons tenté de déterminer la concentration plasmatique de la corticostérone et celle des catécholamines en utilisant respectivement, les techniques de RIA et d'HPLC.

4-1. Détermination des effets du stress physique et psychosocial sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris

4-1-1. Stress physique

La Fig. 47 montre que, le stress physique appliqué à court terme (1j) et à long terme (10j), induit une augmentation significative de la concentration plasmatique de la corticostérone. L'analyse de l'ANOVA à un facteur montre que le stress physique a un effet significatif sur le taux de la corticostérone plasmatique (ANOVA à un facteur: $F(4, 15)= 9.159$; $p= 0.0006$).

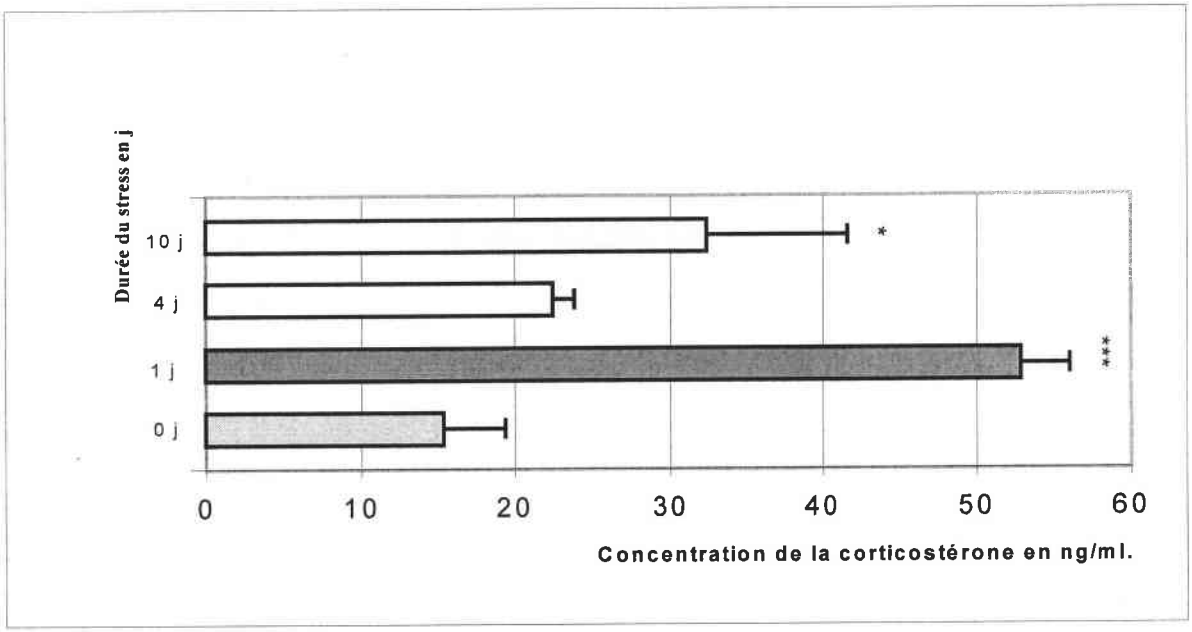


Fig. 47 Effets du stress physique appliqué à court terme et à long terme, sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x4 lots. ***: p<0.001; *: p< 0.05.

4-1-2. Stress psychosocial

Comme le montre la Fig. 48, l'isolement social engendre une augmentation significative (moins importante que le stress physique), de la concentration plasmatique de la corticostérone chez les animaux isolés à court terme (1j) et à long terme (4j). L'analyse de l'ANOVA à un facteur ne montre pas d'effet significatif du stress psychosocial sur le taux de la corticostérone plasmatique (ANOVA à un facteur : $F(4, 15)= 2.035$; $p=0.106$).

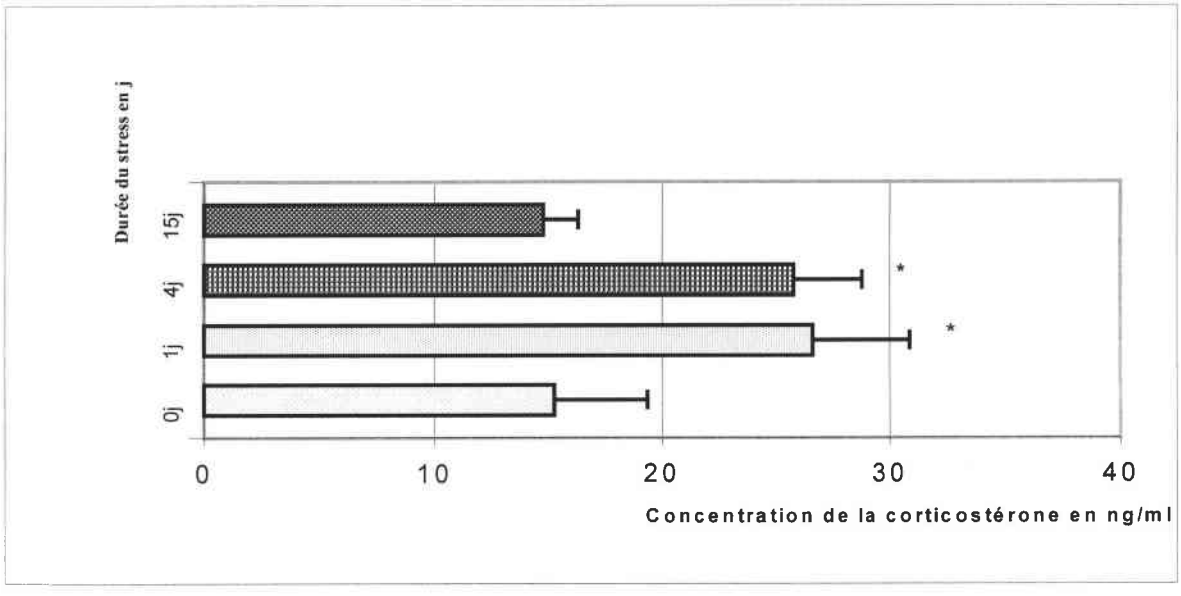


Fig. 48 Effets du stress psychosocial appliqué à court terme et à long terme, sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x4 lots. *: $p<0.05$.

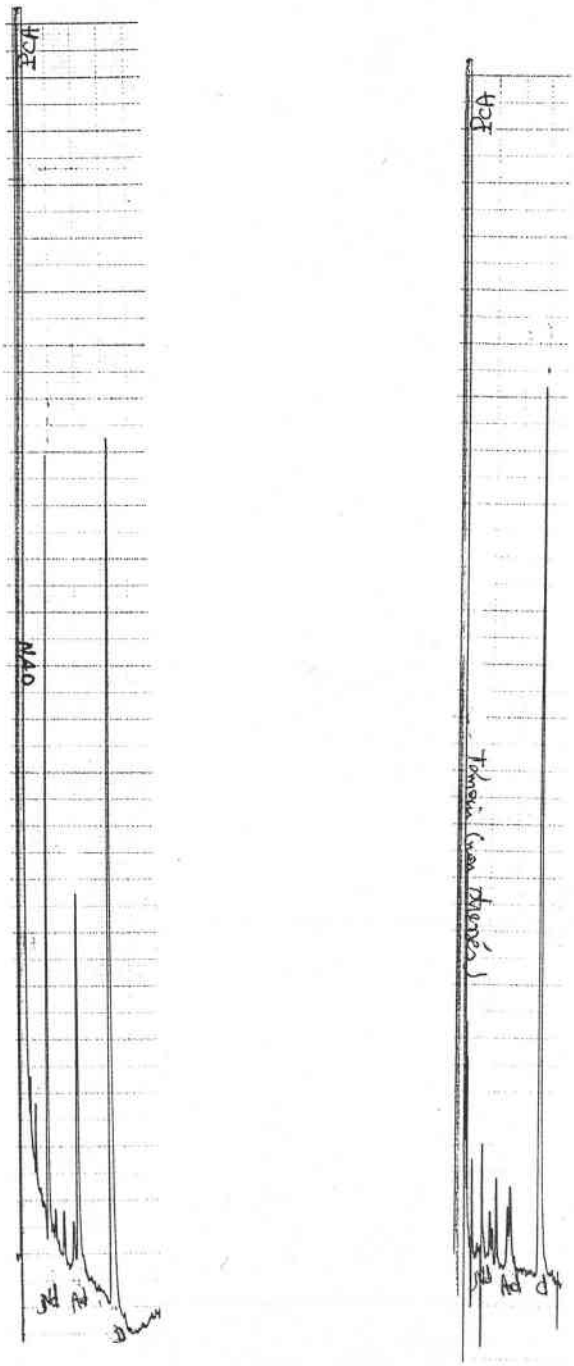
4-2. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme, sur la concentration plasmatique de l'adrénaline et de la noradrénaline chez la souris.

Concernant, le taux plasmatique des catécholamines (l'adrénaline et la noradrénaline), nous nous sommes intéressés uniquement à la comparaison des effets des deux types de stress appliqués à court terme vis à vis de la régulation de la sécrétion de l'adrénaline et de la noradrénaline.

Tableau 16. Détermination des effets du stress physique et psychosocial appliqué à court terme (1j) sur la concentration plasmatique de l'adrénaline et de la noradrénaline chez la souris.

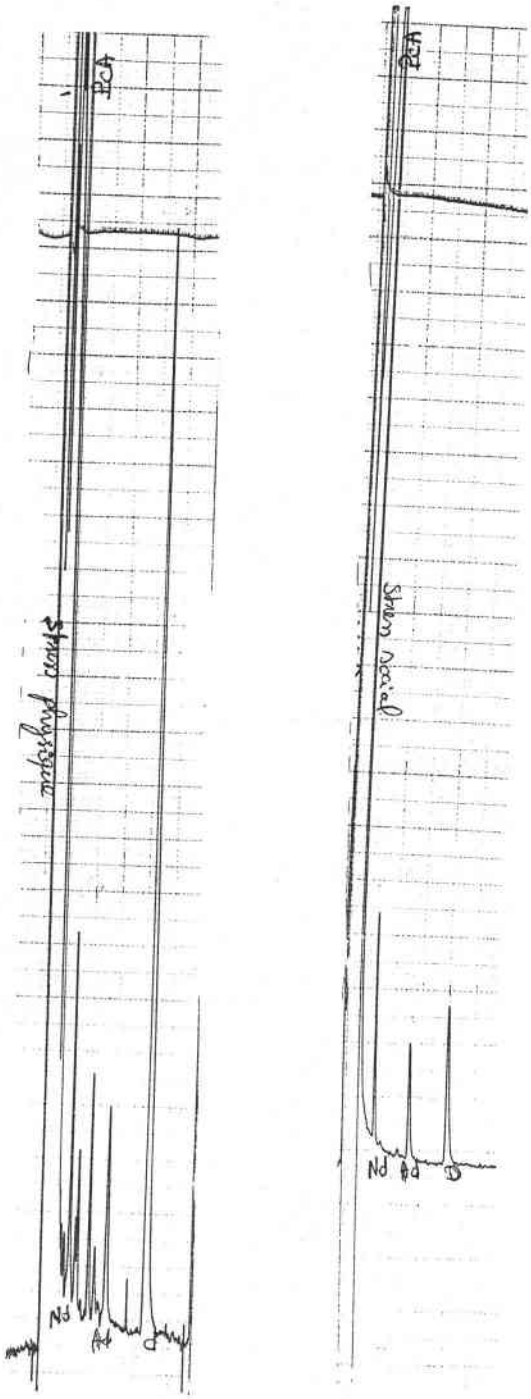
	Nombre d'animaux utilisés	*Adrénaline en pg/ml moy ± SEM Probabilité au test*	*Noradrénaline en pg/ml moy ± SEM Probabilité au test*
Non stressés	5	15.860 ± 0.940 ///	18.310 ± 1.540 ///
Stress physique	5	21.560 ± 1.460 *t-test*=-4.096, p= 0.008	61.500 ± 14.900 *t-test*=-4.289, p= 0.003
Stress psychosocial	5	16.230 ± 1.650 *t-test*=0.214, p= 0.850	46.380 ± 5.580 *t-test*=2.506, p=0.011

Comme le montre le Tableau. 16, le stress physique appliqué à court terme (1j) augmente significativement la concentration plasmatique de l'adrénaline et de façon importante celle de la noradrénaline. Cependant, l'isolement social appliqué à court terme (1j) a plutôt tendance à augmenter de façon moins importante que le stress physique, uniquement la concentration de la noradrénaline (Fig. 49 et Fig. 50). On pourrait supposer dans ce cas là que le stress physique est un modèle de stress, plus intéressant que le modèle du stress psychosocial pour les études pharmacologiques.



(a) (b)

Fig. 49 (a) Chromatogramme du mélange NAD standard.
(b) Chromatogramme réalisé chez des animaux non stressés.
PCA : acide perchlorique, Ad : adrénaline ; Nd :noradrénaline ; D : DHBA



(a) **(b)**

Fig. 50 Chromatogramme réalisé chez des animaux exposés à court terme au stress physique (a) et d'autres exposés à court terme au stress psychosocial (b)

PCA : acide perchlorique, Ad : adrénaline ; Nd :noradrénaline ; D : DHBA

D. Conclusion

Cette deuxième partie de ce travail consiste à étudier les effets de deux modèles de stress appliqué à court terme et à long terme sur les fonctions comportementale, immunitaire, endocrinienne et gastrique chez la souris. Nos résultats ont montré que le stress induit une réduction de l'activité exploratoire (transitions et redressements) chez les animaux exposés au stress physique et psychosocial à toutes les durées dans le test de la chambre claire/obscure. Cependant, l'activité locomotrice (marches montées) et exploratoire (redressements) dans le test de l'escalier, diminuent de façon significative chez les animaux exposés aux deux types de stress. Ces résultats laisseraient supposer que le stress, induit une activation des systèmes inhibiteurs et par conséquent, une inhibition comportementale.

Nous avons constaté aussi que le stress physique augmente considérablement le taux de la corticostérone, de l'adrénaline et de la noradrénaline (hormones de stress) chez les animaux soumis au stress physique par rapport aux animaux non stressés et à ceux exposés au stress psychosocial. Concernant la réponse gastrique, nos résultats ont montré que l'inflammation de la muqueuse gastrique est beaucoup plus importante chez les animaux exposés au stress physique comparé aux animaux isolés. Cette inflammation de la muqueuse gastrique pourrait être expliquée par une forte infiltration des polynucléaires neutrophiles à l'intérieur de la muqueuse gastrique des animaux exposés au stress physique.

Sur le plan immunologique, nos résultats ont montré aussi que le stress physique appliqué à court et à long terme, diminuent le nombre des lymphocytes TCD4, et augmentent plutôt le nombre des cellules NK. Cependant, nous n'avons pas noté de variation significative du nombre des cellules T CD8 chez les animaux exposés au stress physique. Des résultats similaires ont été montrés chez les animaux exposés au stress psychosocial. Nous avons noté une réduction du nombre des lymphocytes TCD4 à toutes les durées du stress psychosocial. Alors que le nombre des cellules NK a augmenté uniquement chez les animaux isolés pendant 1j et 4j.

De façon générale, l'augmentation du nombre des cellules NK, pourrait être liée au détachement des cellules NK de l'endothélium vasculaire, par la fixation des catécholamines sur les récepteurs β2 adrénergiques existants au niveau de la membrane des cellules NK (Benshop *et al.*, 1994; Benshop *et al.*, 1997). Alors que, la réduction du nombre des cellules T CD4 est surtout liée aux effets immunosuppresseurs directs des glucocorticoïdes sur la réponse de type cellulaire (particulièrement les cellules T), en favorisant la réponse humorale (Tamada *et al.*, 1998). En plus des glucocorticoïdes, des neuropepetides endogènes libérés pendant le stress (CRH, ACTH et la β endorphine), exerceraient aussi des effets immunosuppresseurs vis à vis de la réponse cellulaire (Reul *et al.*, 1998).

PARTIE. III

Rôles et implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress.

A. Objectifs

Nous avons défini un objectif :
Evaluer le rôle des récepteurs opioïdes dans les perturbations immunitaires induites par le stress en étudiant l'interaction de la combinaison antagoniste/agoniste des récepteurs opioïdes vis à vis de la dépression immunitaire induite par le stress.
Pour cela, il a été nécessaire de stimuler l'axe opioïde par l'intermédiaire d'un agoniste sélectif (la morphine sulfate), et aussi de bloquer cet axe par un antagoniste (la naloxone) pour étudier les conséquences sur l'immunité cellulaire.

B. Matériels et méthodes

- Recherche des effets des opiacés dans les altérations immunitaires induites par le stress

Pour stimuler l'axe opioïdergique, nous avons administré par voie intrapéritonéale (i.p) à des animaux non stressés et stressés de la morphine sulfate (agoniste des récepteurs opioïdes) à différentes doses : 1mg/kg, 5 mg/kg et 10 mg/kg, 30 min avant l'application du stress (chocs électriques).
Pour bloquer cet axe, nous avons injecté par voie i.p. à d'autres groupes d'animaux non stressés et stressés de la naloxone (antagoniste des récepteurs opioïdes) à trois doses : 2.5 mg/kg, 10 mg/kg et 50 mg/kg, 30 min avant le stress.

Les différents groupes de cette partie de l'étude sont les suivants : (chaque lot est constitué de 9 souris).

- Un lot non stressé traité au NaCl 0.9 %.
- Trois lots non stressés traités aux trois doses de l'agoniste.
- Trois lots non stressés traités aux trois doses de l'antagoniste.
- Un lot stressé traité au NaCl 0.9 %.
- Trois lots stressés traités aux trois doses de l'agoniste.
- Trois lots stressés traités aux trois doses de l'antagoniste.

1. Morphine

1-1. Propriétés physico-chimiques

La morphine est le morphinomimétique le moins liposoluble (Kafuman *et al.*, 1975). Il s'agit d'une base faible, dont 79 % de la concentration sont sous forme ionisée à pH 7.40 et 85 % à 7.20. La morphine est principalement fixée à l'albumine, la fixation protéique est de 30 à 35 % (Fig. 51).

1-2. Pharmacocinétique plasmatique

La voie d'administration la plus intéressante, qui permet d'avoir le maximum de concentration plasmatique est la voie intraveineuse. La diffusion de la morphine dans les tissus est très rapide. La résorption de la morphine administrée par la voie orale, est importante et rapide, mais la biodisponibilité est faible. Cependant, l'administration de la morphine par voie i.m. ou s.c. est rapide, mais instable.

1-3. Métabolisme et élimination

- Métabolisme

La morphine est métabolisée selon trois voies principales :

Glycuroconjugaison, sulfoconjugaison et N déméthylation (Yei *et al.*, 1977). La glycuroconjugaison est la voie métabolique principale. Elle transforme la morphine en dérivés glucuroconjugués en 3,6 ou en 3 et 6 par l'action de l'UDP glucuronyl-transférase, c'est la conjugaison en 3 qui est la plus importante.

La morphine est aussi métabolisée en d'autres métabolites mineurs tels la normorphine et la codéine qui peuvent exercer également une activité analgésique. Le métabolisme de la morphine se fait principalement au niveau hépatique.

- Elimination

L'élimination est urinaire, par filtration glomérulaire et excrétion tubulaire.

1-4. Utilisation clinique

La morphine est prescrite par voie sous cutanée, intramusculaire, intraveineuse, sous-arachnoïdienne et péridurale. Quelquefois utilisée en prémédication, elle est en fait surtout prescrite durant la période postopératoire et en cas de douleurs aiguës sévères. La morphine est aussi prescrite dans le cas des douleurs chroniques cancéreuses et préférentiellement par voie orale.

2. La naloxone (Narcan ^{R})

2-1. Propriétés physicochimiques

La naloxone est très soluble (Kafuman *et al.*, 1975). Son poids moléculaire est de 363.83 et son pK_a de 7.82 (Fig. 52).

2-2. Pharmacocinétique

La concentration plasmatique de la naloxone diminue très rapidement après son administration par voie i.v. La diffusion tissulaire est rapide, les concentrations dans les structures cérébrales sont 10 à 15 fois plus élevées que celle de la morphine.

2-3. Métabolisme

Le métabolisme se fait principalement au niveau du foie par glycuroconjugaison.

2-4. Utilisation clinique

La naloxone est utilisée pour antagoniser la dépression respiratoire induite par les morphiniques. Cette action s'associe à une régression de l'analgésie.

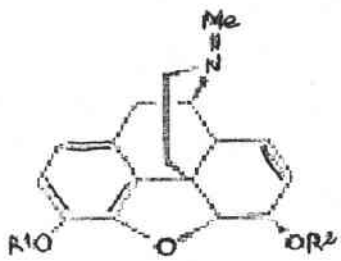


Fig. 51 Structure de la morphine

Morphine : $R^1 = R^2 = H$

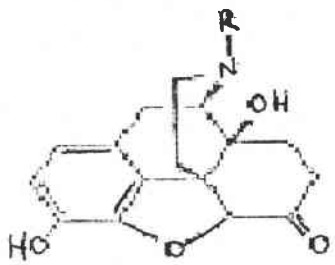


Fig. 52 Structure de la naloxone

Naloxone : R= CH_3-CH=CH_2

C. Résultats

- Détermination de l'implication des récepteurs opioïdes dans les altérations immunitaires induites par le stress.

1. Détermination des effets de la morphine, agoniste sélectif des récepteurs opioïdes de type μ, sur l'immunité cellulaire chez la souris.

1-1. Effets de la morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4).

Comme le montre la Fig. 53, le traitement des animaux non stressés à la morphine aux doses 1, 5, 10mg/kg, entraîne une diminution du nombre des lymphocytes T CD4 par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 %, particulièrement à la dose 1mg/kg (respectivement: p= 0.0001; p= 0.0001; p= 0.0001). On constate aussi que le traitement à la morphine renforce les effets suppressifs du stress sur le nombre des lymphocytes TCD4 surtout aux doses 5 et 10 mg/kg (respectivement: p= 0.007; p=0.04), puisque l'effet de la dose 1mg/kg chez les souris stressées ne diffère pas statistiquement de l'effet de cette même dose chez les souris non stressées.

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: $F(1,46)= 64.821$; $p= 0.0001$.
Effet du traitement: $F(3,46)= 16.580$; $p= 0.0001$.
Interaction: $F(3,46)= 4.865$; $p= 0.005$

L'analyse statistique montre bien l'existence d'une interaction synergique statistiquement significative (p= 0.005) entre le traitement à la morphine et le stress dans la dépression du nombre des cellules T CD4 chez les animaux stressés.

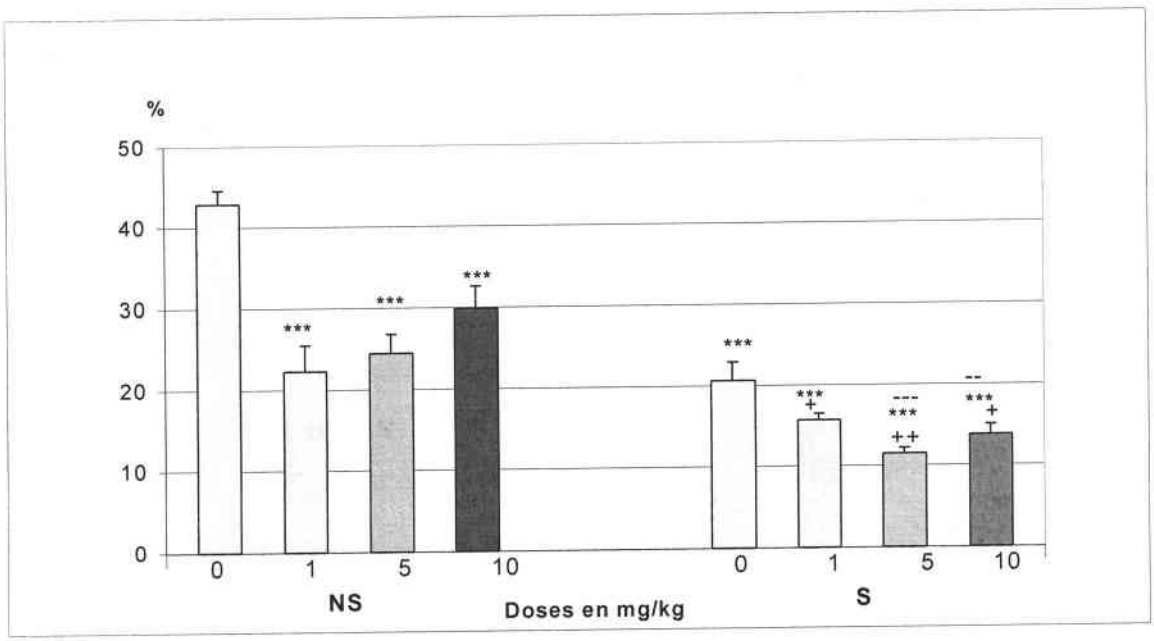


Fig. 53 Effet de la morphine sur le nombre des TCD4 chez les souris stressées. N=9x 8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS1,5et10; S0,S1,5 et 10; +: S0/S1,5 et 10; -: NS5,10/S5,10.

1-2. Effets de la morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8).

La Fig. 54 montre que la morphine réduit significativement le nombre des lymphocytes TCD8 à toutes les doses (1 mg/kg, 5 mg/kg et 10 mg/kg) chez les animaux non stressés (respectivement :p= 0.004; p= 0.003; p= 0.0001). On constate aussi chez les animaux soumis au stress que le prétraitement à la morphine à toutes les doses, entraîne une importante diminution du nombre des lymphocytes TCD8 par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement : p= 0.003; p=0.0001; p= 0.017).
Les animaux stressés et prétraités aux doses 1mg/kg et 5mg/kg n'ont pas montré de variation significative par rapport aux animaux non stressés et traités aux mêmes doses. Cependant l'effet de la dose 10 mg/kg varie significativement comparé à celui de cette même dose chez les animaux non stressés. On pourrait supposer qu'en présence du stress, l'effet de la dose 10 mg/kg de la morphine est moins important, vis à vis du nombre des cellules TCD8, comparé à l'effet de la morphine sur le nombre des TCD8 chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré une interaction entre le stress et le traitement vis à vis de la régulation du nombre des T CD8.

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: F(1,46)= 1.999; p= 0.164.
Effet du traitement: F(3,46)= 11.027; p= 0.0001.
Interaction: F(3,46)= 3.427; p= 0.034.

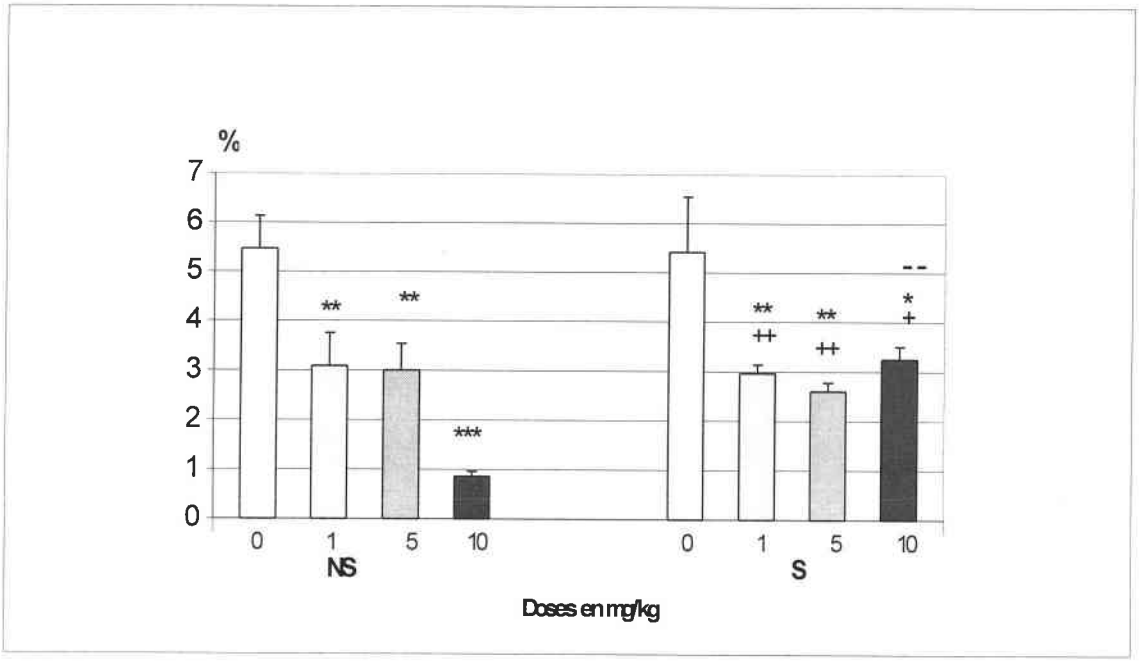


Fig. 54 Effet de la morphine sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.*: NS0/NS1,5et10 ; S0,S1,5 et 10; +: S0/S1,5 et 10; -: NS10/S10.

1-3. Effets de la morphine sur le nombre des cellules NK

Contrairement aux effets de la morphine sur le nombre des sous populations TCD8 et TCD4, le nombre des cellules tueuses naturelles NK augmente de façon significative chez les animaux non stressés et traités à la morphine aux doses 5 et 10 mg/kg (respectivement : p= 0.0003 ; p= 0.0004).

On constate aussi qu'un prétraitement des animaux stressés à la morphine à toutes les doses (1, 5 et 10 mg/kg), semble renforcer les effets du stress sur le nombre des cellules NK par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %, en particulier aux doses 1mg/kg et 5mg/kg (p= 0.0001, p=0.03), puisque l'effet de la dose 10mg/kg n'est pas statistiquement différent de celui de cette même dose chez les animaux non stressés (Fig. 55).

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: F(1,46)= 45.131; p= 0.0001.
Effet du traitement: F(3,46)= 14.223; p= 0.0001.
Interaction: F(3,46)= 8.509; p= 0.0001.

Les résultats montrent bien l'existence d'une interaction synergique entre le stress et le traitement à la morphine vis à vis de la régulation de la réponse des cellules NK.

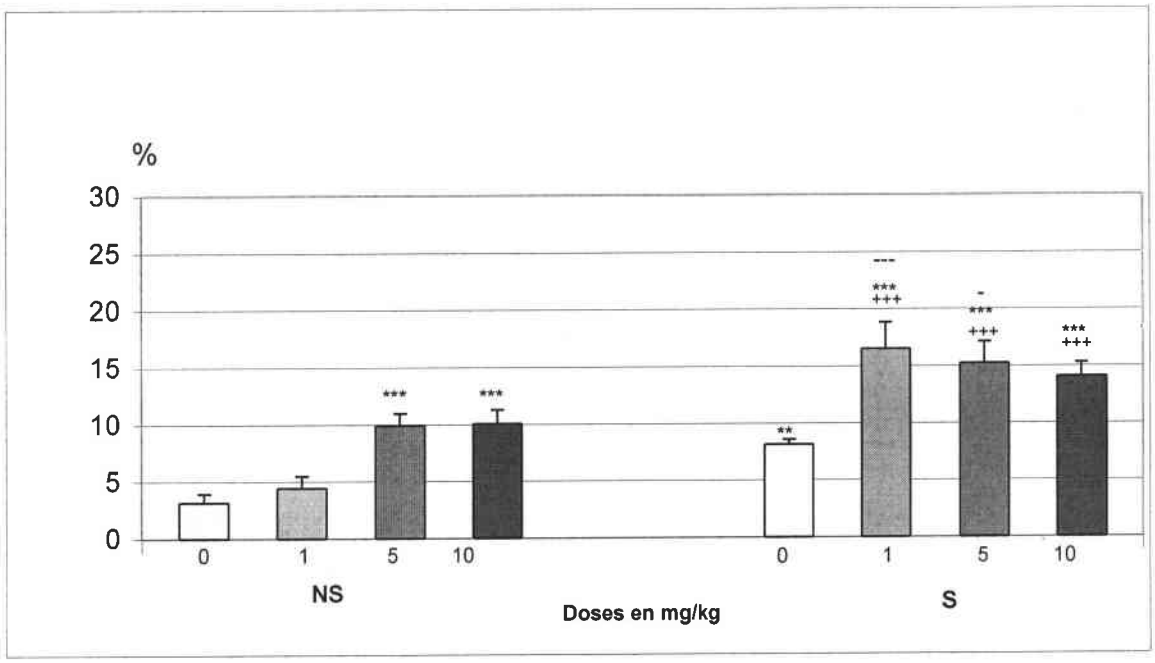


Fig. 55 Effet de la morphine sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots.
NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS5,10; S0,S1,5 et 10 ; +: S0/S1,5 et 10; -:NS 1,5/S 1,5.

2. Détermination des effets de la naloxone, antagoniste des récepteurs opioïdes , sur l'immunité cellulaire chez la souris.

2-1. Effets de la naloxone sur la réponse des lymphocytes T auxiliaires (TCD4).

Comme le montre la Fig. 56, le traitement à la naloxone entraîne une diminution du nombre des lymphocytes TCD4 à toutes les doses chez les animaux non stressés (respectivement: p= 0.0001; p= 0.0001; p=0.0001). Cependant, un prétraitement à la naloxone chez des animaux stressés, a tendance à atténuer sensiblement les effets du stress, puisqu'il augmente le nombre des lymphocytes TCD4 chez les animaux traités aux doses 10 et 50 mg/kg par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9% (respectivement : p=0.04; p= 0.003).

La dose 2 mg/kg renforce plutôt les effets suppressifs du stress sur le nombre des lymphocytes TCD4 chez les animaux stressés (p= 0.019) et cet effet est statistiquement significatif comparé aux animaux non stressés.

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: $F(1,52)= 28.698$; $p= 0.0001$.
Effet du traitement: $F(4, 52)= 11.002$; $p= 0.0001$.
Interaction: $F(2, 52)= 15.725$; $p= 0.0001$.

Ces résultats montrent une interaction entre le traitement à la naloxone et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD4. On pourrait supposer que la naloxone à la dose 2mg/kg, agit comme un agoniste des récepteurs opioïdes chez les animaux stressés, puisque son effet se rapproche de celui de la morphine sur la réponse des T CD4.

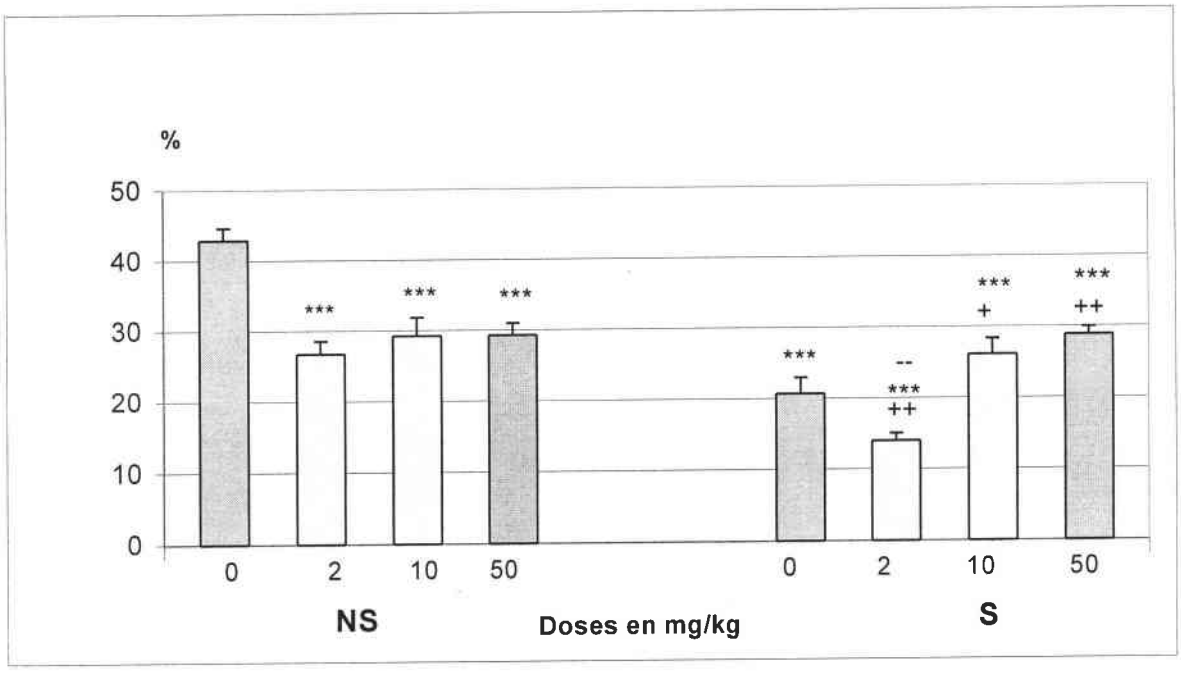


Fig. 56 Effet de la naloxone sur le nombre des T CD4 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.*: NS0/NS2,10 et 50; S0,2,10 et 50; +: S0/S2,10 et 50 ; -:NS2/S2.

2-2. Effets de la naloxone sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (T CD8).

Comme le montre la Fig. 57 le traitement aux doses 10 et 50mg/kg, entraîne une légère diminution non significative du nombre des lymphocytes T CD8 par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement: p=0.119; p=0.092; p= 0.07). De façon similaire, on constate qu'un prétraitement des animaux stressés à la naloxone, ne varie pas significativement le nombre des lymphocytes T CD8 par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9% (respectivement: p= 0.935; p= 0.344; p= 0.208).

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: F(1,52)= 0.718; p= 0.400.
Effet du traitement: F(4, 52)= 2.540; p= 0.050.
Interaction: F(2, 52)= 0.321; p= 0.726.

L'analyse statistique n'a pas montré d'interaction entre le stress et le traitement vis à vis de la régulation du nombre des cellules T CD8.

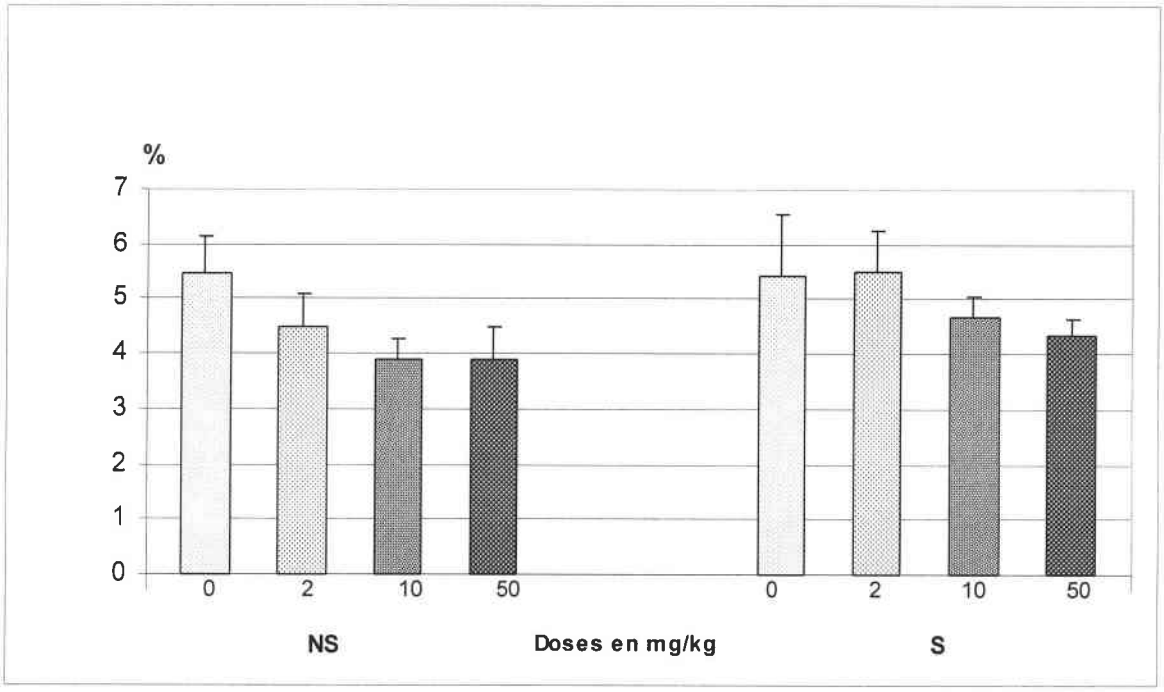


Fig. 57 Effet de la naloxone sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.

2-3. Effets de la naloxone sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez la souris (NK)

La Fig. 58 montre une importante augmentation du nombre des cellules NK chez les animaux non stressés, après un traitement à la naloxone et à toutes les doses (respectivement: p= 0.001; p= 0.018; p= 0.009). Par ailleurs, un prétraitement à la naloxone à 2mg/kg et à 10mg/kg, renforce les effets du stress sur le nombre des cellules NK (respectivement : p= 0.002 ; p= 0.012). Cependant, la dose 50mg/kg semble inverser les effets du stress sur le nombre des cellules NK chez les animaux stressés (p= 0.020), l'effet de cette dose n'est pas statistiquement différent de celui de cette même dose chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré une interaction entre le traitement à la naloxone et le stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

ANOVA à deux facteurs : Effet du stress: F(1,52)= 6.487; p= 0.013.
Effet du traitement: F(4,52)= 13.516; p= 0.0001.
Interaction: F(2,52)= 6.442; p= 0.0032.

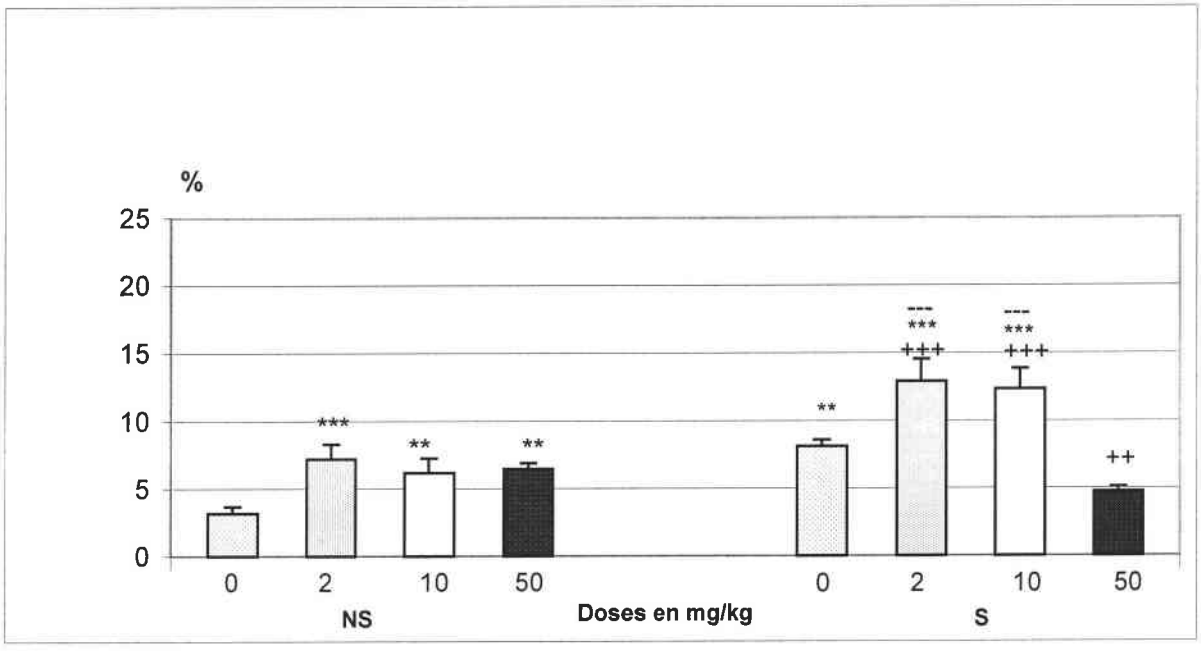


Fig. 58 Effet de la naloxone sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS2,10 et 50 ; S0,S2,10; +: S0/S2,10; -:NS2 et10/S2et10 .

3. Détermination de l'implication directe des récepteurs opioïdes dans la réponse immunitaire au stress.

3-1. Détermination des effets de la combinaison naloxone/ morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4) chez les animaux stressés.

Les résultats de la Fig. 59 montrent qu'en général, le nombre des cellules T CD4 diminue chez les animaux traités à la naloxone et à la morphine en présence ou en absence du stress. On constate aussi chez les animaux non stressés que le prétraitement à la naloxone (2 et 10mg/kg), n'affecte pas significativement le nombre des cellules TCD4 comparé aux animaux non stressés et traités à la morphine.

Cependant, la naloxone 2mg/kg antagonise de façon importante les effets immunodépresseurs de la morphine 5mg/kg vis à vis du nombre des lymphocytes T CD4 chez les animaux stressés (p= 0.0001), puisque l'effet de cette combinaison est statistiquement différent de celui observé chez les animaux stressés et traités à la morphine 5mg/kg ou à la naloxone 2mg/kg.

Ces résultats montrent que la naloxone antagonise parfaitement les effets immunodépresseurs de la morphine sur cette catégorie cellulaire chez les animaux soumis au stress expérimental. L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction entre le prétraitement par la naloxone, le traitement par la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD4 ($F(2, 96)= 12.235$; $p= 0.001$).

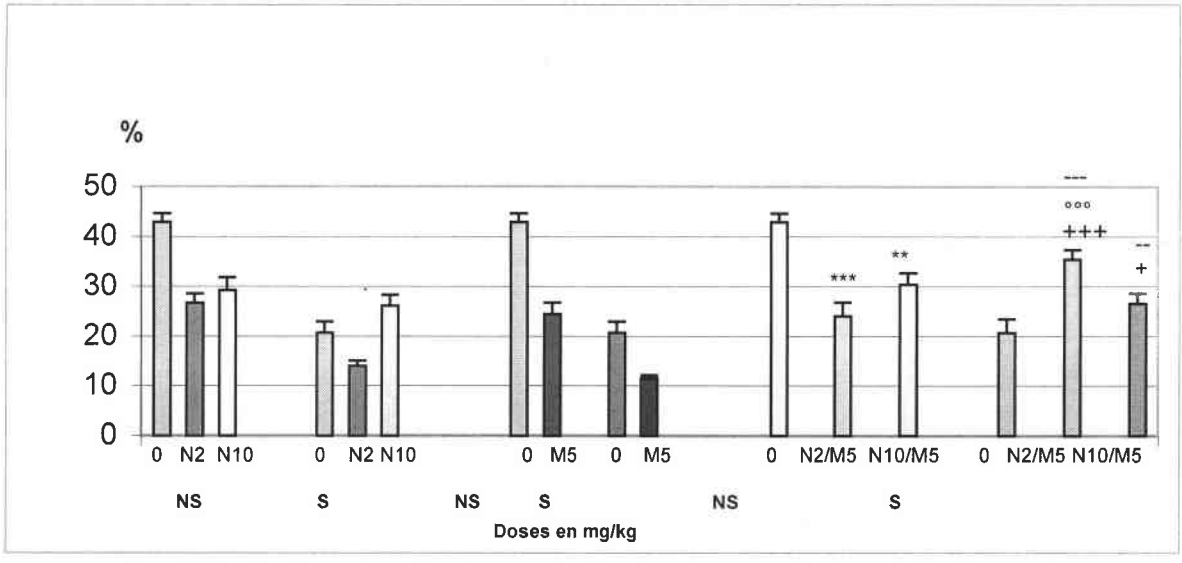


Fig. 59 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *: NSN0//NSN2,10/M5; °:SN2//SN2/M5; +:SN0//SN2,10/M5;-:SM5//SN2,10/M5.

3-2. Détermination des effets de la combinaison naloxone/morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8) chez les animaux stressés.

Comme le montre la Fig. 60, les combinaisons de la naloxone (2 et 10 mg/kg) et la morphine 5mg/kg chez les animaux non stressés, semblent réduire le nombre des cellules TCD8 (respectivement: p= 0.005; p= 0.0009), mais l'effet de ces combinaisons ne varie pas significativement comparé à celui observé chez les animaux non stressés et traités à la morphine 5mg/kg ou à la naloxone (2 et 10mg/kg). De façon similaire, les mêmes combinaisons n'affectent pas significativement le nombre des TCD8 chez les animaux stressés (respectivement: p= 0.515; p= 0.191), puisque l'effet de ces deux combinaisons ne différent pas des effets de la naloxone 2 et 10 mg/kg chez les animaux stressés.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs ne montre pas d' interaction du prétraitement par la naloxone, le traitement par la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD8.

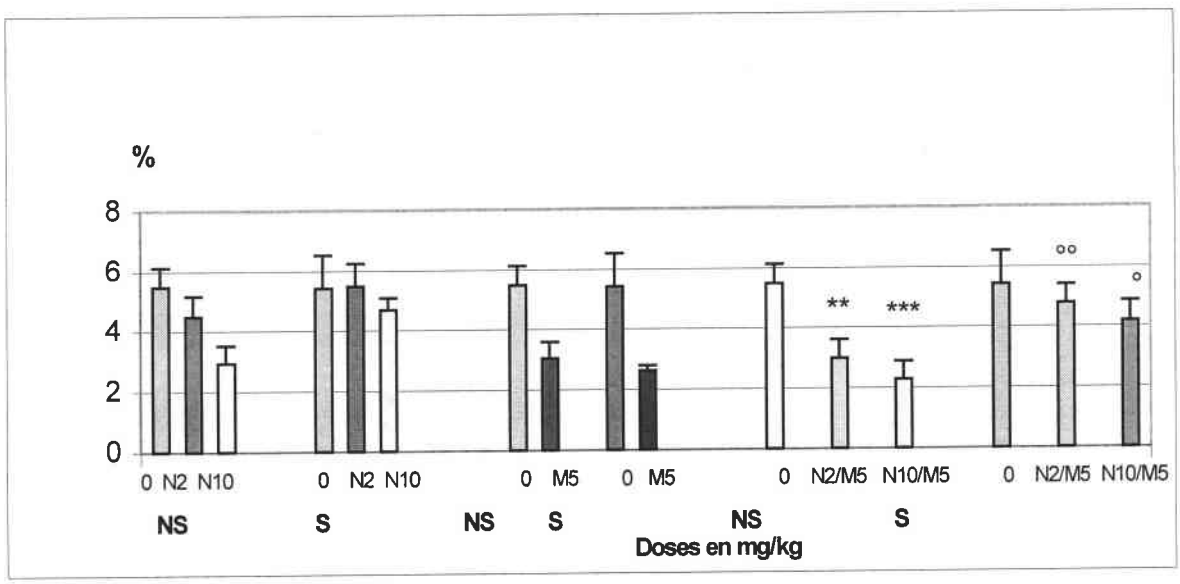


Fig. 60 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSN0//NSN2,10/M5;°:SM5//SN2,10/M5.

3-3. Détermination des effets de la combinaison naloxone/morphine sur le nombre des cellules tueuses naturelles (NK) chez les animaux stressés.

On constate que les combinaisons de la naloxone (2 et 10 mg/kg) et la morphine 5mg/kg, rétablissent le taux de base des cellules NK chez les animaux non stressés, leurs effets sont statistiquement significatifs comparé aux effets propres des produits chez les animaux non stressés.

Chez les animaux stressés, la combinaison de la naloxone 2 mg/kg et la morphine 5 mg/kg, réduit significativement le nombre des cellules NK, l'effet de cette combinaison est statistiquement différent de celui observé chez les animaux stressés et traités à la morphine 5mg/kg ou à la naloxone 2mg/kg (Fig. 61).

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction du prétraitement par la naloxone, le traitement par la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK ($F(2,96)= 10.326$; $P= 0.012$).

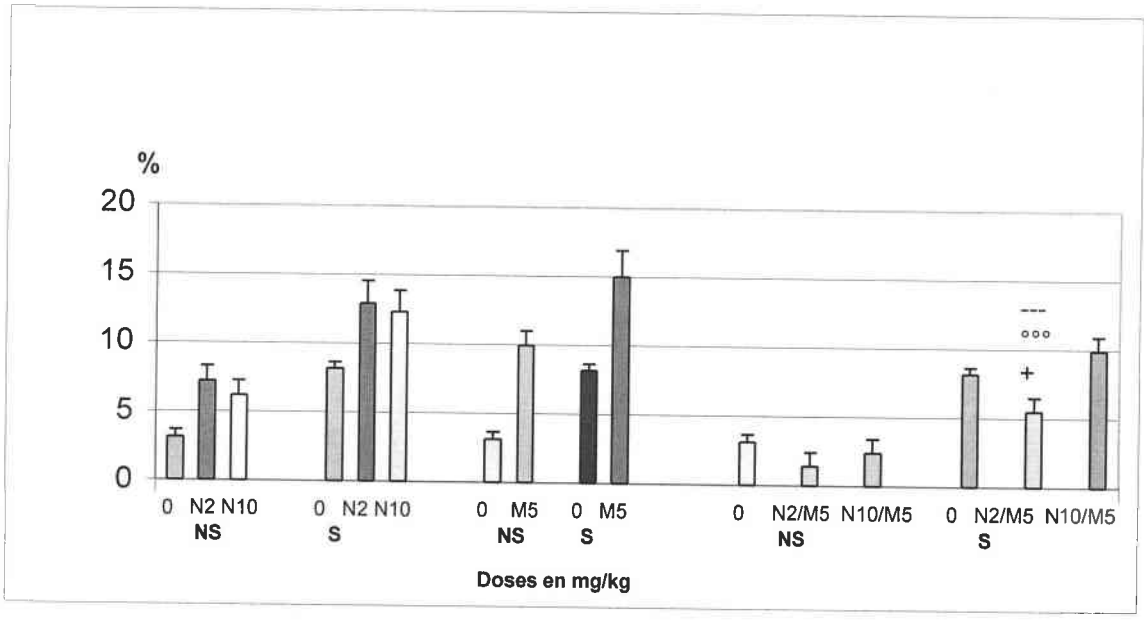


Fig. 61 Implications des récepteurs opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés.
+ : S0/SN2/M5; °:SN2//SN2/M5; -: SM5//SN2/M5.

D. Conclusion

Cette partie a mis en évidence d'une part, les effets suppressifs de la morphine vis à vis de la régulation de la réponse de l'immunité cellulaire (TCD4, T CD8 et NK) chez les animaux non stressés. D'autre part, nos résultats ont montré que la morphine potentialise les effets immunosuppresseurs du stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules T CD4, TCD8 et NK. Ces résultats laisseraient supposer que le stress, entraîne une libération de peptides opioïdes endogènes, qui activent l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien, sécrète à son tour les glucocorticoïdes dont les effets immunosuppresseurs sont connus (Marroti *et al.*, 1996). On pourrait aussi appuyer l'hypothèse de l'action directe des opioïdes au niveau des récepteurs membranaires des cellules immunitaires (Radulescu *et al.*, 1991)

Nous avons noté aussi que le traitement à la naloxone chez les animaux stressés et non stressés, engendre pratiquement les mêmes effets que la morphine vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4 et celui des NK. On pourrait supposer que la naloxone administrée seul, agit comme un agoniste des récepteurs opioïdes à la fois chez les animaux non stressés et stressés.

Cependant un prétraitement des animaux stressés par la naloxone, antagonise en partie les effets immunodépresseurs du stress et de la morphine vis à vis de la régulation du nombre des cellules T CD4 et celui des cellules NK. Ces résultats mettent l'accent sur l'implication partielle du système opioïde dans les effets immunodépresseurs induits par le stress expérimental chez la souris.

PARTIE. IV

Rôles et implications des récepteurs benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress

A. Objectifs

Cette partie de l'étude a pour but :
D'évaluer le rôle des récepteurs benzodiazépiniques dans les perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress, en étudiant l'interaction antagoniste/agoniste de ces récepteurs pour déterminer leur implication directe dans l'altération de l'immunité cellulaire induite par le stress.

Pour cela, il a été nécessaire de stimuler l'axe benzodiazépinique par l'intermédiaire d'un agoniste (clorazépate dipotassique : Tranxène), et aussi de bloquer cet axe par un antagoniste (flumazénil : Anexate^{R}) pour étudier d'une part, les conséquences sur l'immunité cellulaire, et d'autres part, évaluer l'implication des récepteurs benzodiazépiniques dans l'altération immunitaire.

B. Matériels et méthodes

- Recherche des effets des benzodiazépines sur l'immunité cellulaire chez la souris.

Pour stimuler l'axe benzodiazépinique, on a administré par voie i.p à des animaux non stressés et stressés, du clorazépate dipotassique (agoniste des récepteurs benzodiazépiniques) à différentes doses : 1mg/kg, 5 mg/kg et 10 mg/kg, 30 min avant l'application du stress (chocs électriques).

Cependant pour bloquer cet axe, on a administré à d'autres groupes d'animaux non stressés et stressés du flumazénil (antagoniste des récepteurs benzodiazépiniques) à trois doses: 1mg/kg, 5mg/kg et 10 mg/kg (on rajoute une goutte de Tween 80 pour solubiliser le produit), 30 min avant le stress. Les animaux sont sacrifiés 24 heures après la séance de stress.

Les différents groupes étudiés sont les suivants : (chaque groupe est constitué de 9 souris).

- Un lot non stressé traité au NaCl 0.9 %.
- Trois lots non stressés traités aux trois doses de l'agoniste.
- Trois lots non stressés traités aux trois doses de l'antagoniste.
- Un lot stressé traité au NaCl 0.9 %..
- Trois lots stressés traités aux trois doses de l'agoniste.
- Trois lots stressés traités aux trois doses de l'antagoniste

1. Clorazépate dipotassique

1-1. *Rappel sur les propriétés physiologiques*

En 1958, une nouvelle classe de médicaments à visée psychotrope a été découverte, les benzodiazépines. Ces molécules se caractérisent par trois propriétés majeurs :

(voir Fig. 62)

- Anxiolytique.
- Hypnotique
- Myorelaxante.

1-2. *Pharmacocinétique du* clorazépate dipotassique

1-2-1. *Métabolisme du* clorazépate dipotassique

La présence, dans sa formule, de groupements hydrophiles rend le clorazépate dipotassique soluble dans le milieu gastrique. Une fraction est absorbée telle quelle, tandis qu'une importante partie est transformée en N desméthyl diazépam, principale

forme d'absorption digestive. Dans l'organisme, le N desméthyl diazépam est transformé en Oxazépam. Il en est de même pour la plus grande partie du clorazépate absorbé.

1-2-2. *Elimination*

Dans l'urine, la principale forme d'élimination est représentée par la forme glycuroconjuguée de l'Oxazépam et des très petites quantités de Clorazépate.

2. Flumazénil (Anexate^{R})

C'est une imidazobenzodiazépinone, elle est synthétisée pour la première fois en 1979, et commercialisée sous le non d'Anexate^{R} (Roche).
La seule différence avec la famille des BZD est l'absence du groupe phénol, qui est remplacé par un groupe carbonyle (Fig. 63).

2-1. *Propriétés physicochimiques*

- Le point de fusion : 200 °C.
- pKa : 1.7.
- La solubilité: 0.4g/l.
- Son poids moléculaire: 330.

2-2. *Pharmacocinétique et pharmacodynamie*

Le flumazénil peut être administré par voie intraveineuse, voie intrapéritonéale ou par voie orale. Le plus souvent, c'est les voies orale et intrapéritonéale qui sont les plus utilisées expérimentalement. Le flumazénil est complètement métabolisé dans le foie en forme libre d'acide carboxylique correspondant au glucuronide. Il restera moins de 0.2 % du flumazénil non métabolisé qui sera excréter dans les urines.
Le flumazénil est un antagoniste des récepteurs BZD, mais de légères propriétés agonistiques et agoniste inverse ont été démontré dans différents tests et chez différentes espèces (File *et al.*, 1982). A fortes doses, le flumazénil exerce une activité

agoniste chez l'homme (Higgit *et al.*, 1986). L'administration de doses pharmacologiques (1-2mg/kg) cause de légers effets secondaires tels que : migraine, vertiges, rougeur.

Ces effets indésirables sont expliqués par le fait que le flumazénil n'antagonise pas tous les soustypes des récepteurs BZD. En clinique, le flumazénil est surtout utilisé pour inverser les effets somnifères des BZD et aussi pour éliminer les effets d'un empoisonnement aux BZD.

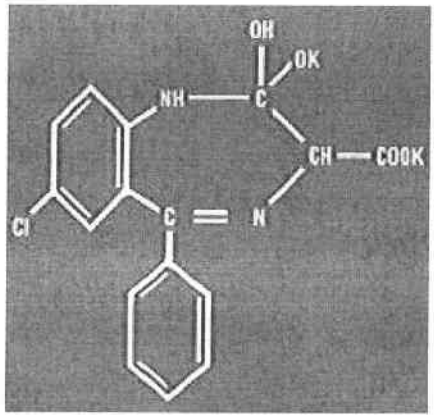


Fig. 62 Structure du clorazépate dipotassique

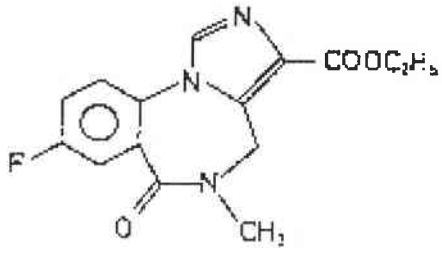


Fig. 63 Structure du Flumazénil

(Anexate [R])

C.Résultats

- Effets des benzodiazépines sur l'immunité cellulaire chez la souris

1. Détermination des effets du clorazépate dipotassique, agoniste des récepteurs benzodiazépiniques, sur l'immunité cellulaire chez les animaux stressés .

1-1. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4).

Comme le montre la Fig. 64, les doses 0.1 et 1 mg/kg du clorazépate dipotassique diminuent significativement le nombre des lymphocytes T CD4 chez les animaux non stressés (respectivement: p= 0.03 ; p= 0.028). Cependant, le clorazépate dipotassique a plutôt tendance à augmenter à la dose 0.1mg/kg, le nombre des lymphocytes TCD4 chez les animaux stressés (p= 0.0001), puisque l'effet de cette dose est différent statistiquement de celui de cette même dose chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré une interaction entre le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD4.

ANOVA à deux facteurs : - Effet du stress: F(1,53)= 1.737; p= 0.193.
- Effet du traitement: F(3,53)= 3.931; p= 0.013.
- Interaction: F(2,52)= 19.328; p= 0.0001.

Chez les animaux non stressés, l'effet du clorazépate dipotassique à faible dose vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4, semble être comparé à celui du stress seul. Cependant chez les animaux stressés, les faibles doses du clorazépate dipotassique ont tendance à s'opposer aux effets immunodépresseurs du stress sur le nombre des cellules T CD4.

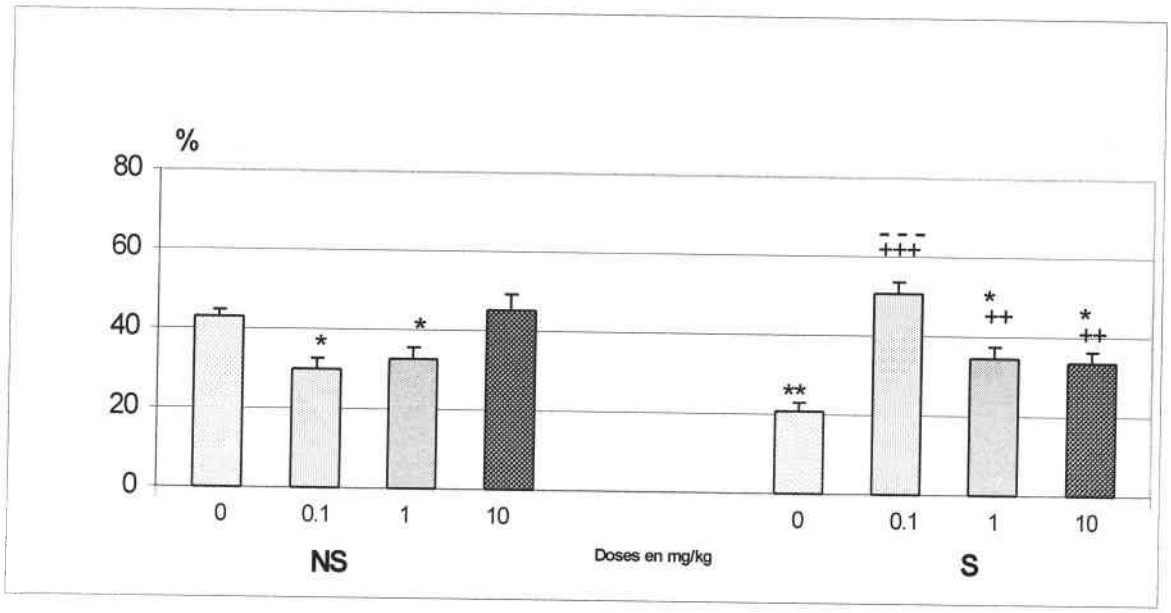


Fig. 64 Effet du clorazépate dipotassique sur le nombre des T CD4 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS0.1 et1; S0,1 et 10; +: S0/S0.1,1et 10; -: NS0.1/S0.1.

1-2. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques.

On constate que le clorazépate dipotassique à faibles doses a tendance à diminuer le nombre des lymphocytes TCD8 chez les animaux non stressés (p= 0.011). Cependant, le nombre des cellules T CD8 n'a pas varié significativement chez les animaux stressés et traités au clorazépate dipotassique à toutes les doses (Fig. 65).
L'analyse statistique n'a pas montré d'interaction entre le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD8.

ANOVA à deux facteurs : - Effet du stress: F(1,52)= 0.084; p= 0.773.
- Effet du traitement: F(3,52)= 5.471; p= 0.0024.
- Interaction des deux facteurs: F(3,52)= 2.980; p= 0.39.

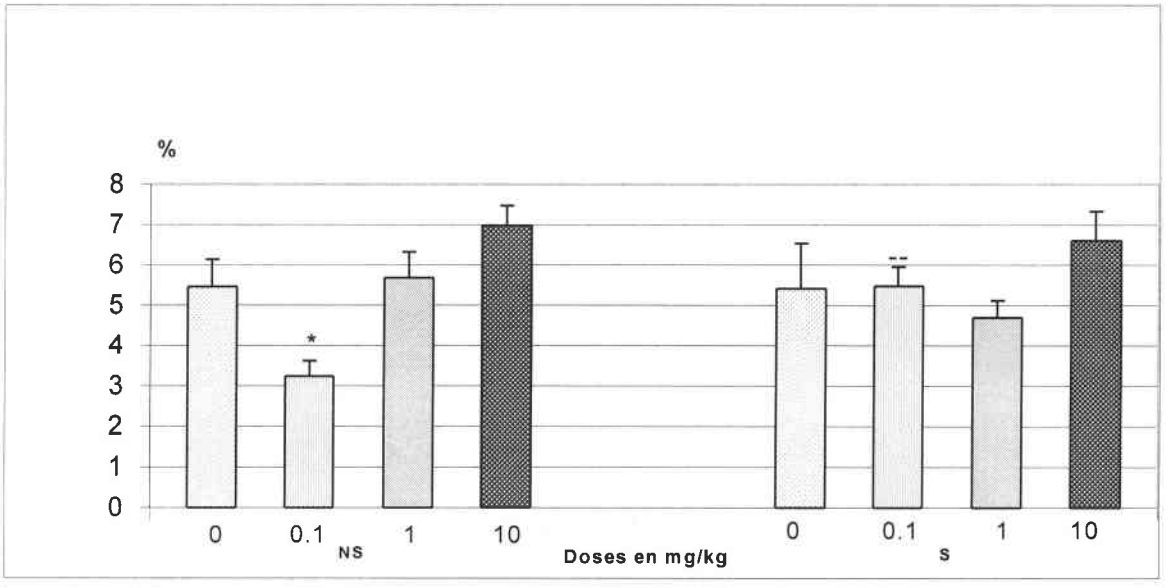


Fig. 65 Effet du clorazépate dipotassique sur le nombre des T CD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés;S: stressés.*: NS0/NS0.1,10;-: NS0.1/S0.1.

1-3. Effets du clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules tueuses naturelles (NK).

La Fig. 66 montre que les doses 0.1 et 1mg/kg, engendrent une augmentation significative du nombre des cellules NK chez les animaux non stressés (respectivement : p= 0.008; p= 0.0001). Cependant, le clorazépate dipotassique administré aux animaux stressés semble agir différemment sur le nombre des cellules NK en le réduisant surtout à la dose 0.1mg/kg (p= 0.03), puisque l'effet de la dose 10mg/kg ne varie pas significativement comparé à celui de cette même dose chez les animaux non stressés.
L'analyse statistique a montré une interaction entre le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

ANOVA à deux facteurs:

- Effet du stress: F(1, 51)= 1.362; p= 0.248.
- Effet du traitement: F(3, 51)= 13.248; p= 0.0001.
- Interaction: F(3, 51)= 5.775; p= 0.0018.

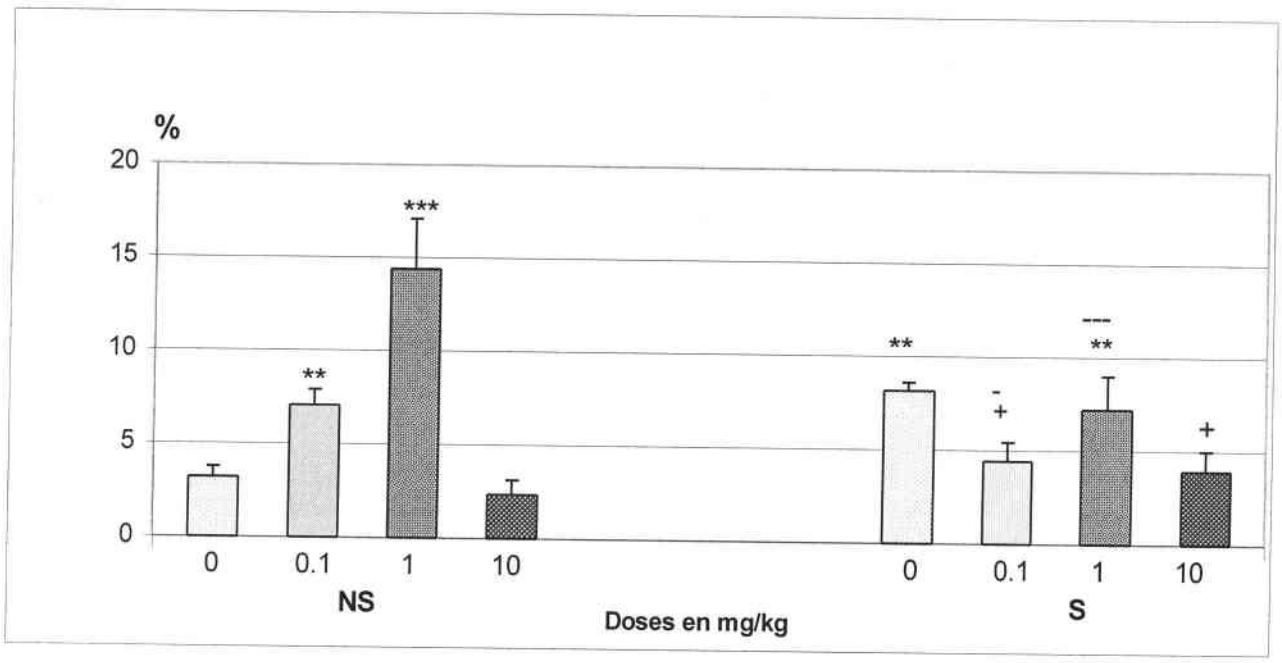


Fig. 66 Effet du clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules NK chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés.*: NS0/NS 0.1,1; S0, S1 ; +:S0/S0.1,10; -: NS 0.1,1/S0.1,1.

2. Détermination des effets du flumazénil, antagoniste sélectif des récepteurs benzodiazépiniques, sur l'immunité cellulaire chez la souris.

2-1. Effets du flumazénil sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4)

Comme le montre la Fig. 67, le flumazénil semble augmenter le nombre des cellules T CD4 en particulier chez les animaux stressés et traités au flumazénil 5 et 10 mg/kg (respectivement: p= 0.005; p= 0.001), l'effet de ces doses ne varient pas significativement de celui de ces mêmes doses chez les animaux non stressés. Cependant, le nombre des T CD4 ne varie pas chez les animaux non stressés et traités à toutes les doses du flumazénil par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 %. L'analyse statistique montre une interaction entre le stress et le traitement vis à vis de la régulation des cellules T CD4. Cette interaction est due probablement à la

différence significative entre l'effet de la dose 2.5mg/kg chez les non stressés et les stressés.

ANOVA à deux facteurs:

- Effet du stress: F(1, 48)= 38.642; p= 0.0001.
- Effet du traitement: F(3, 48)= 0.295; p= 0.829.
- Interaction: F(3, 48)= 3.187; p= 0.032.

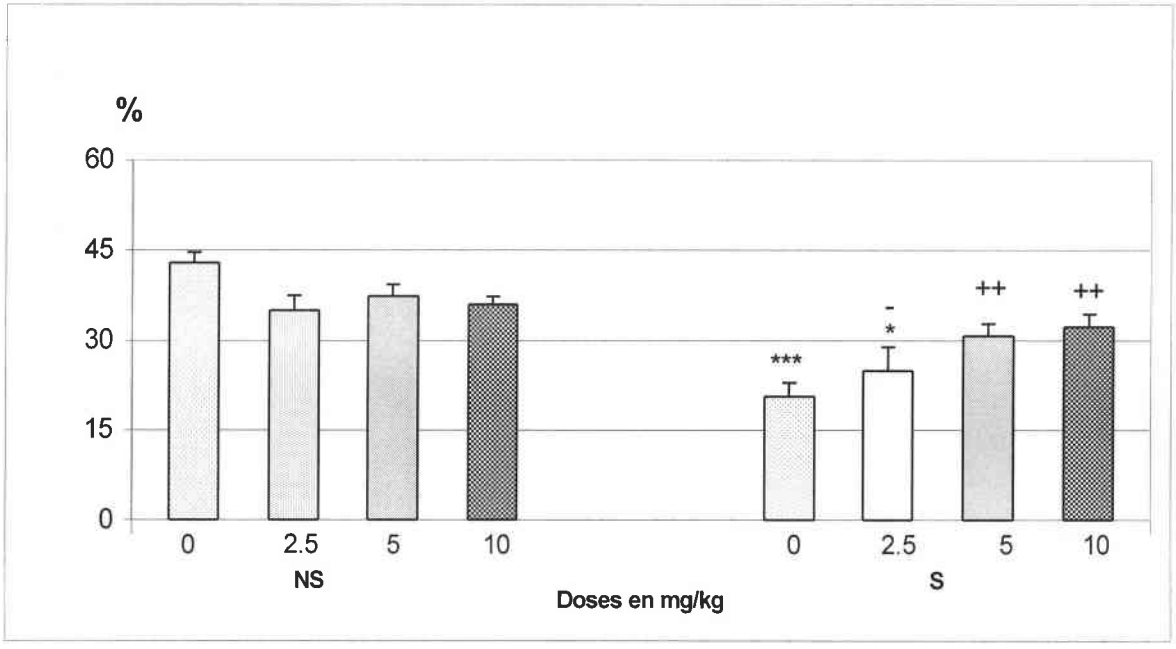


Fig. 67 Effet du flumazénil sur le nombre des TCD4 chez les souris stressés. N=9x8 lots. NS : non stressés ; S : stressés. * : NS0/ S0,S2.5 ; +: S0/S5,10 ; - :NS2.5/S2.5.

2-2. Effets du flumazénil sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8).

La Fig. 68 montre que le traitement à toutes les doses du flumazénil ne semblent pas affecter significativement le nombre des cellules T CD8 chez les animaux non stressés. Cependant le traitement au flumazénil 5mg/kg, induit une réduction du nombre des T CD8 chez les animaux stressés. L'effet de la dose 5mg/kg est statistiquement différent de celui de cette même dose chez les animaux non stressés.

ANOVA à deux facteurs:

- Effet du stress: F(1, 48)= 9.798; p= 0.045.
- Effet du traitement: F(3, 48)= 0.864; p= 0.466.
- Interaction: F(3, 48)= 1.229; p= 0.309.

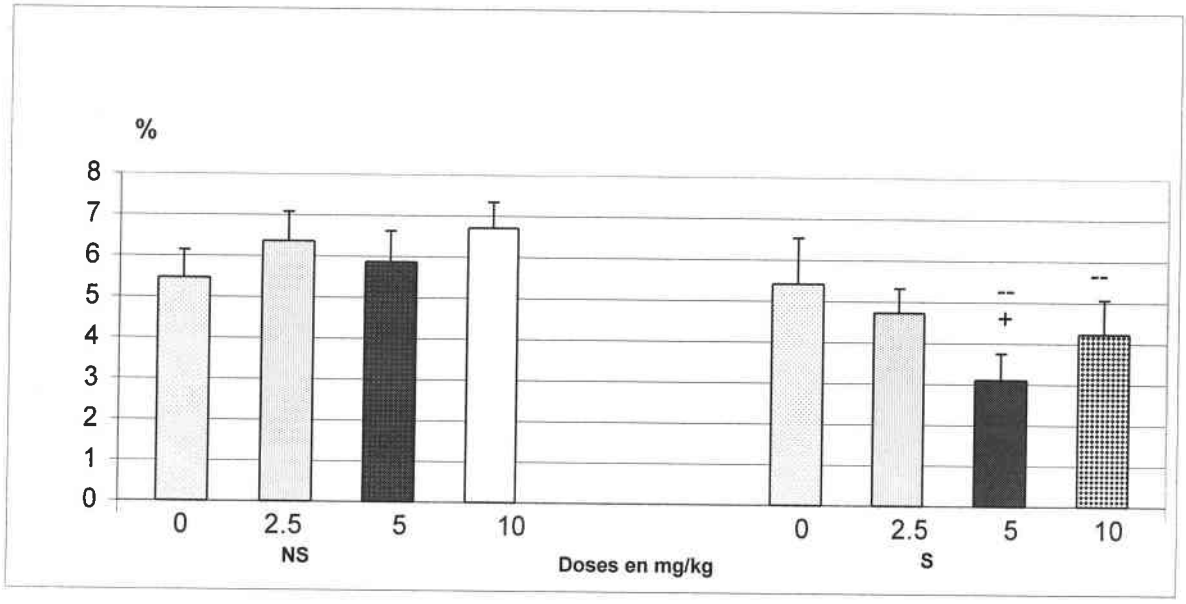


Fig. 68 Effet du flumazénil sur le nombre des TCD8 chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. +:S0/S5;-: NS5,10/S5,10.

2-3. Effets du flumazénil sur le nombre des cellules tueuses naturelles (NK)

Comme le montre la Fig. 69, on constate que le flumazénil a deux profils pharmacologiques différents, quand il s'agit des animaux non stressés ou stressés. Le traitement aux doses fortes 5 et 10 mg/kg montrent une augmentation significative du nombre des cellules NK (respectivement: p= 0.0001; p= 0.0001) par rapport aux animaux non stressés traités au NaCl 0.9 %. Cependant les mêmes doses, induisent une réduction du nombre des cellules NK chez les animaux stressés (respectivement : p=0.012, p=0.004). L'effet des doses 5 et 10mg/kg est statistiquement significatif comparé à celui de ces mêmes doses chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré une interaction entre le stress et le traitement vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

ANOVA à deux facteurs :

- Effet du stress: F(1, 48)= 22.616; p= 0.0001.
- Effet du traitement: F(3, 48)= 5.069; p= 0.0039.
- Interaction: F(3, 48)= 22.496; p= 0.0001.

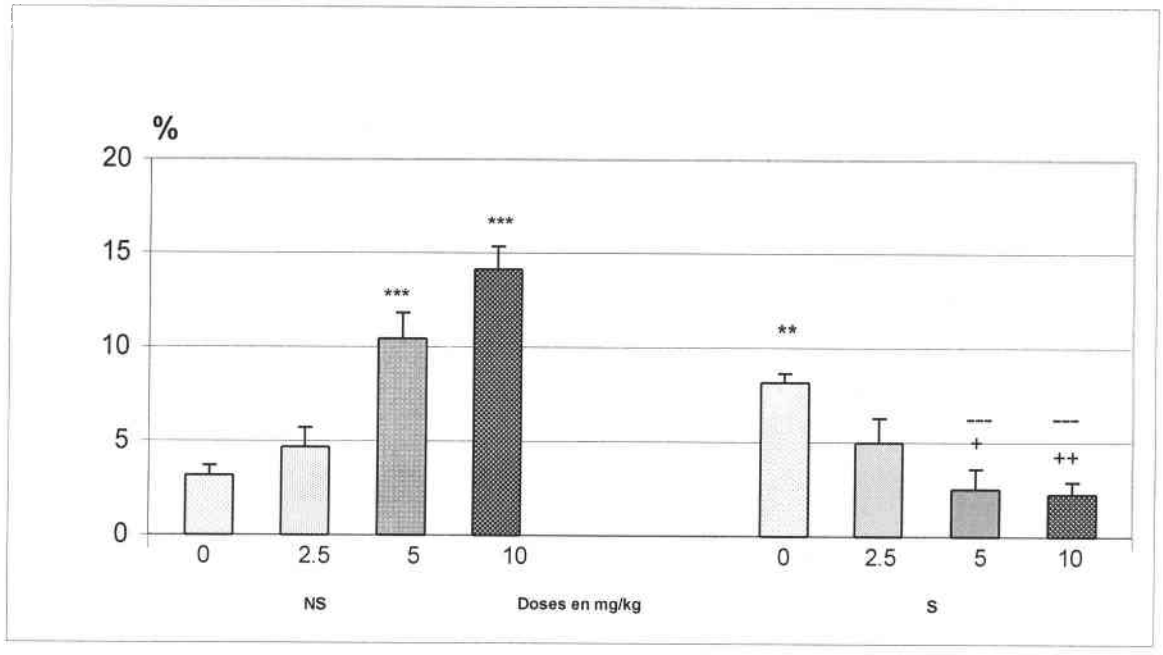


Fig. 69 Effet du flumazénil sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez les souris stressées. N=9x8 lots. NS : non stressés; S: stressés. *: NS0/NS0, NS5,10; +:S0/S5,10; -: NS5,10/S5,10.

3. Détermination de l'implication directe des récepteurs benzodiazépiniques dans la réponse immunitaire au stress.

3-1. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires chez la souris.

Comme le montre la Fig. 70, la combinaison du flumazénil 2.5 mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1mg/kg, semble augmenter le nombre des lymphocytes TCD4 (p= 0.04) chez les animaux stressés mais l'effet de cette combinaison n'est pas différent significativement de l'effet observé chez les animaux stressés et traités au flumazénil 2.5mg/kg.

Cependant la combinaison du flumazénil 5mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1 mg/kg, provoque plutôt une importante diminution du nombre des cellules T CD4 (p= 0.0001), l'effet de cette combinaison est différent statistiquement de celui observé chez les animaux stressés et traités au flumazénil 5mg/kg ou au clorazépate dipotassique 0.1mg/kg. Chez les animaux non stressés, les deux combinaisons du flumazénil 2.5 et 5mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1mg/kg, semblent diminuer le nombre des T CD4 en comparaison aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p= 0.03, p=0.008). Cet effet n'est pas différent de l'effet propre au flumazénil 2.5 et 5 mg/kg et de celui du clorazépate dipotassique chez les animaux non stressés. L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD4 ($F(2, 96)= 11.639$; $p= 0.002$).

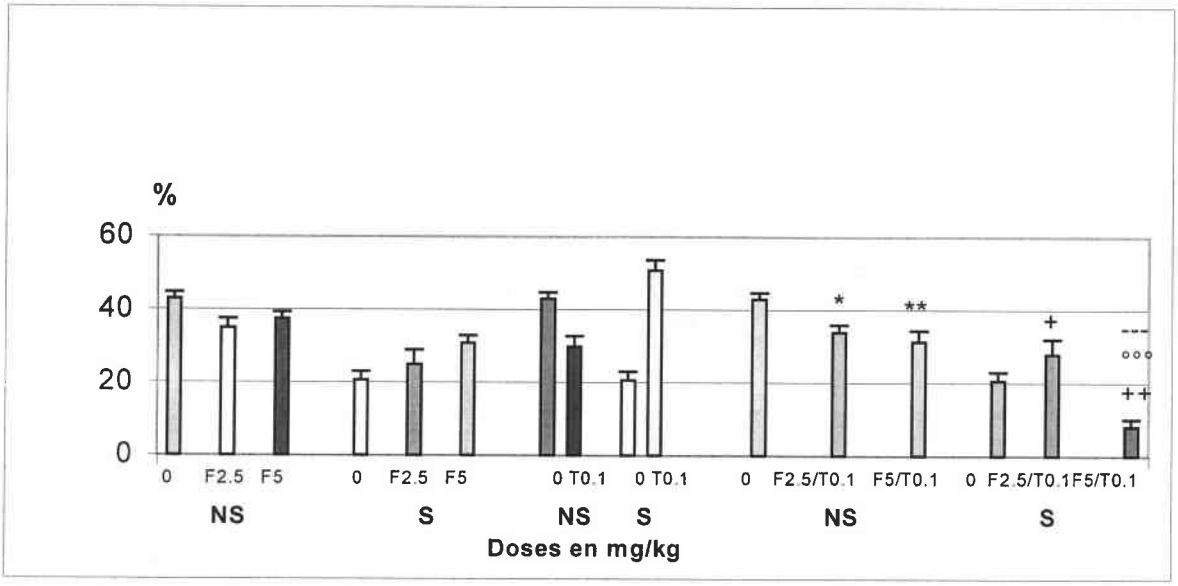


Fig. 70 Implications des récepteurs benzodiazépeniques dans la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF2.5,5/T0.1;+:SF0//SF2.5,5/T0.1; °:SF5//SF5/T0.1; -: ST0.1//SF5/T0.1

3-2. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/clorazépate dipotassique sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8) chez la souris.

Comme le montre la Fig. 71, les combinaisons du flumazénil 2.5mg/kg et 5mg/kg avec le clorazépate dipotassique 0.1 mg/kg, semblent diminuer le nombre des lymphocytes T CD8 chez les animaux non stressés (respectivement: p= 0.0049; p= 0.0001), puisque l'effet de ces combinaisons n'est pas différent de celui du clorazépate dipotassique seul. Chez les animaux stressés, la combinaison 5mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1mg/kg, semble diminuer le nombre des TCD8 (p=0.007), l'effet de cette combinaison n'est pas différent statistiquement de l'effet propre au flumazénil chez les animaux stressés.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs ne montre pas d'interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des T CD8.

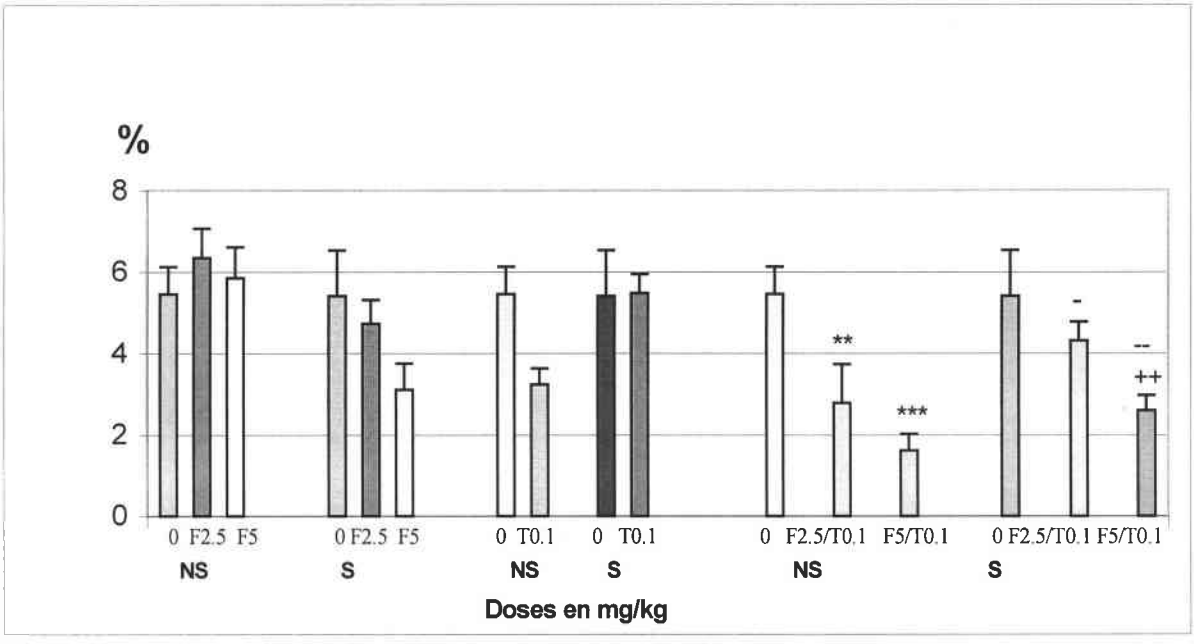


Fig. 71 Implications des récepteurs benzodiazépeniques dans la réponse des TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF2.5,5/T0.1; +:SF0//SF5/T0.1; -:ST0.1//SF2.5,5/T0.1.

3-3. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/clorazépate dipotassique sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez la souris (NK).

Les résultats de la Fig. 72 ont montré que les combinaisons du flumazénil 2.5mg/kg et 5mg/kg avec le clorazépate dipotassique 0.1 mg/kg, entraînent une diminution significative du nombre des cellules NK par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p= 0.004, p= 0.025). Chez les animaux stressés, on constate un légère augmentation du nombre des cellules NK après un traitement à la combinaison flumazénil 2.5mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1mg/kg, dont l'effet est statistiquement significatif par rapport à l'effet propre du flumazénil 2.5mg/kg et celui du clorazépate dipotassique 0.1mg/kg. Cependant la combinaison 5mg/kg et le clorazépate dipotassique 0.1mg/kg, semble induire une diminution du nombre des cellules NK (p=0.006), l'effet de cette combinaison n'est pas différent de l'effet propre aux deux produits chez les animaux stressés.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement au clorazépate dipotassique et le stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK ($F(2, 96)= 10.569$; $p= 0.004$).

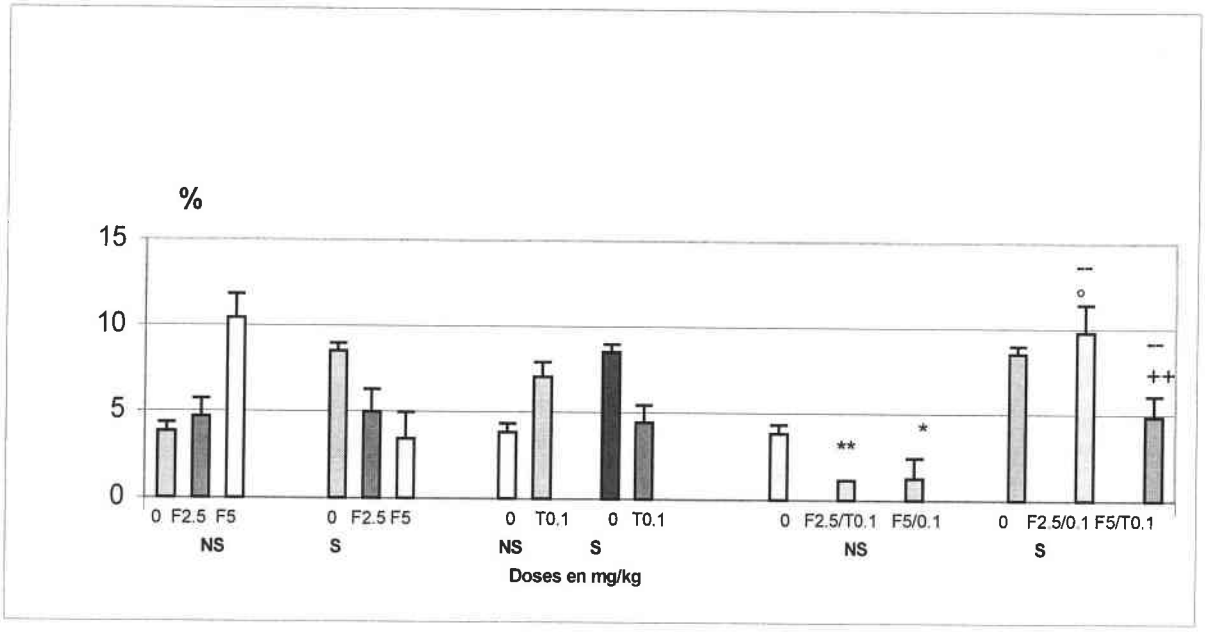


Fig. 72 Implications des récepteurs benzodiazépiniques dans la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF2.5,5/T0.1; +:SF0//SF5/T0.1; °:SF2.5//SF2.5/T0.1; -:ST0.1//SF2.5,5/T0.1.

D. Conclusion

Les résultats de cette partie montrent que le clorazépate dipotassique à faible dose possède des effets immunoprotecteurs vis à vis de la régulation de la réponse cellulaire (TCD4 et NK) des animaux stressés. Cependant chez les animaux non stressés, nous avons constaté que le clorazépate dipotassique agit comme un agoniste inverse vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4 et celui des cellules NK, puisqu'il semble mimer les effets du stress comparé aux animaux stressés et non traités au clorazépate dipotassique. Ces résultats laisseraient supposer que les faibles doses des benzodiazépines, empêchent l'augmentation de la libération des glucocorticoïdes, probablement responsables de l'immunodépression induite par l'application du stress (Freeman & Thurmond, 1986). On pourrait aussi appuyer l'hypothèse des études de Beinlich *et al.*, (1999) et Carmel *et al.*, (1999), qui ont montré un effet biphasique des benzodiazépines sur la prolifération cellulaire. Les faibles concentrations stimulent la synthèse de l'ADN, alors que les fortes concentrations induisent plutôt des effets antiprolifératifs.

L'administration du flumazénil seul, a plutôt tendance à agir uniquement sur la réponse des cellules NK chez les animaux stressés et non stressés. Nos résultats ont aussi montré que le prétraitement au flumazénil avant l'administration du clorazépate dipotassique, entraîne un antagonisme vis à vis de la régulation du nombre des TCD4 et celui des cellules NK chez les animaux stressés. On pourrait supposer que l'action protectrice du clorazépate dipotassique contre les effets immunodépresseurs du stress passe bien via les récepteurs benzodiazépiniques vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4 et en partie vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

Partie. V

Interactions des systèmes opioïdergiques et benzodiazépiniques dans les perturbations immunitaires induites par le stress.

A. But du travail

L'objectif principal de cette étude est de mettre en évidence une éventuelle interaction des systèmes benzodiazépiniques et opioïdes vis à vis des perturbations de l'immunité cellulaire induites par le stress.

Cet objectif général se propose de comparer des groupes d'animaux stressés et non stressés ayant reçu l'antagoniste des récepteurs benzodiazépiniques (flumazénil), 30 min avant l'administration de l'agoniste des récepteurs opioïdes (morphine), dans le but d'évaluer l'implication et l'interaction de ces récepteurs dans la réponse cellulaire des animaux stressés.

B. Matériels et méthodes

Pour bloquer l'axe benzodiazépinique, on a administré par i.p. à des animaux non stressés et stressés du flumazénil 5 et 10mg/kg, 30 min avant l'administration de la morphine 5mg/kg. Les différents lots étudiés se composent de 9 à 10 souris :

- Un lot non stressé traité au NaCl 0.9 %.
- Deux lots non stressés traités aux deux combinaisons antagoniste/agoniste.
- Un lot stressé traité au NaCl 0.9 %.
- Deux lots stressés traités aux deux combinaisons antagoniste/agoniste.

C. Résultats

- Interactions des systèmes opioïdergiques et benzodiazépiniques dans les altérations immunitaires induites par le stress.

1. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des lymphocytes T auxiliaires (TCD4) chez les animaux stressés (Fig. 73).

Nos résultats montrent que la combinaison du flumazénil 5mg/kg et la morphine 5mg/kg, semble réduire le nombre des cellules T CD4 chez les animaux non stressés ($p=0.0001$). L'effet de cette combinaison n'est pas statistiquement différent de l'effet propre à la morphine 5mg/kg chez les animaux non stressés. De la même manière, le traitement à la combinaison du flumazénil 10mg/kg et la morphine 5mg/kg, semble augmenter le nombre des cellules T CD4 par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9% ($p=0.011$), puisque cet effet n'est pas statistiquement différent de celui observé chez les animaux stressés et traités au flumazénil 10mg/kg.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement à la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des TCD4 ($F(2, 96)= 5.645$; $p= 0.023$). On pourrait expliquer cette interaction par la variation significative entre le traitement combiné du flumazénil (5 et 10 mg/kg)/la morphine et le traitement à la morphine 5mg/kg chez les animaux stressés.

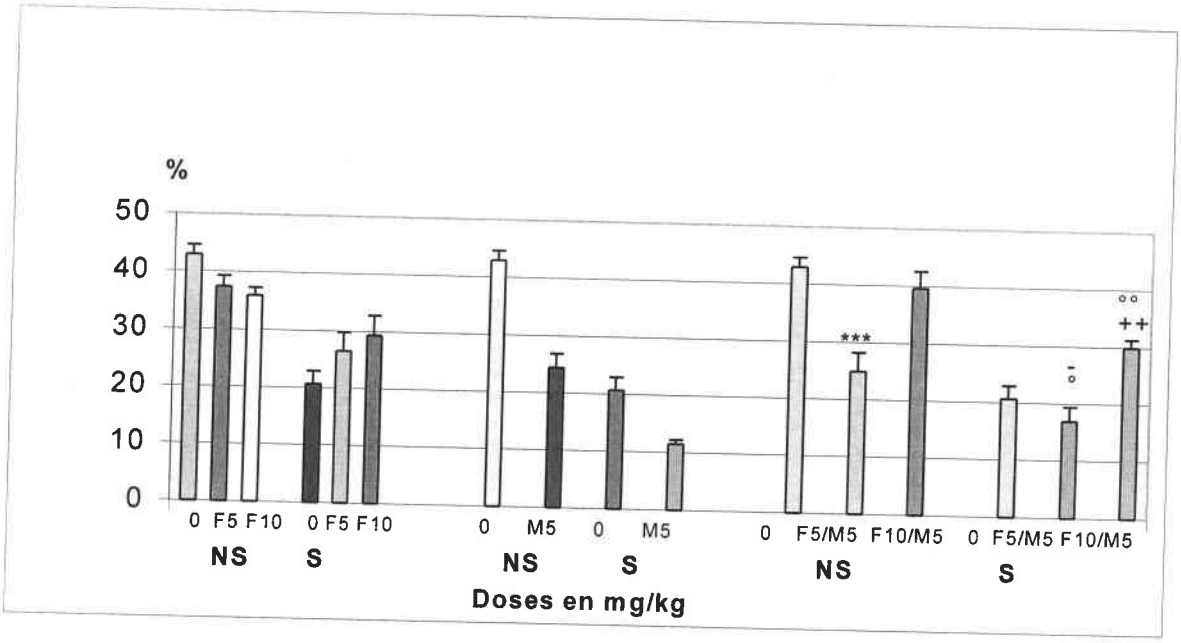


Fig. 73 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans la réponse des TCD4 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. *:NSF0//NSF5/M5; +:SF0//SF10/M5 ; °:SM5//SF5,10/M5; -:SF5//SF5/M5.

2. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques (TCD8) chez les animaux stressés.

Comme le montre la Fig. 74, les combinaisons du flumazénil 5mg/kg, 10 mg/kg et la morphine 5mg/kg, semblent réduire le nombre des cellules T CD8 chez les animaux non stressés (respectivement, p= 0.018, p= 0.007), l'effet de ces combinaisons ne diffère pas de l'effet propre à la morphine 5mg/kg chez les animaux non stressés. Cependant les mêmes combinaisons, n'affectent pas significativement le nombre des cellules T CD8 chez les animaux stressés.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs ne montre pas d'interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement à la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des TCD8.

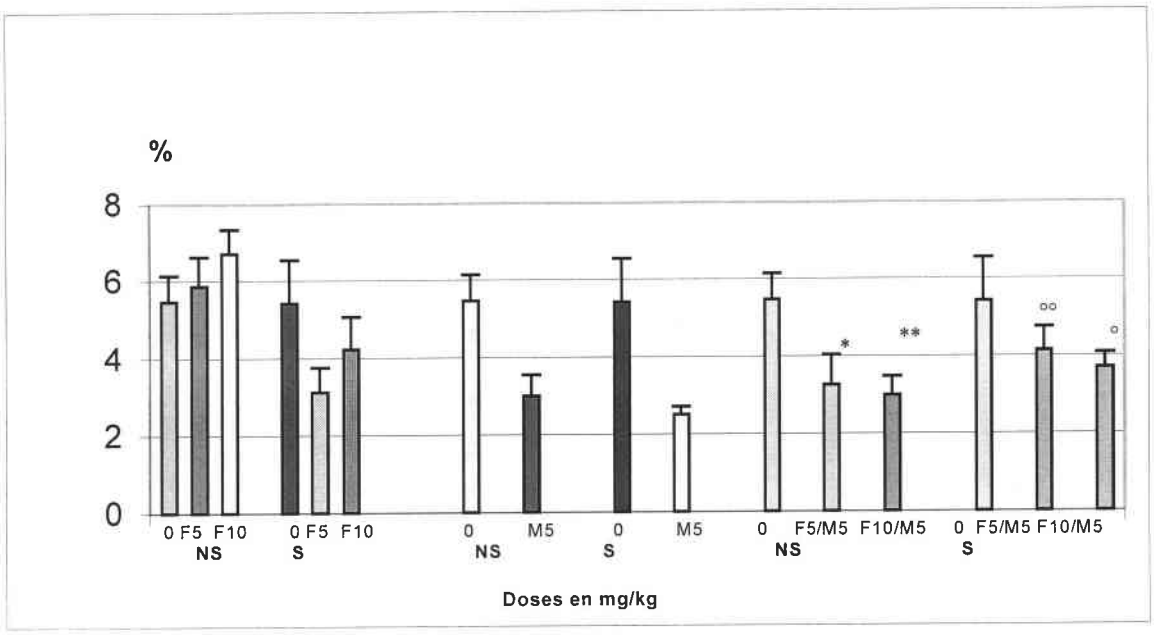


Fig. 74 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans la réponse des TCD8 chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. * : NSF0//NSF5,10/M5; ° : SM5//SF5,10/M5.

3. Détermination des effets de la combinaison flumazénil/morphine sur le nombre des cellules tueuses naturelles chez les animaux stressés. (Fig. 75)

On constate que la combinaison du flumazénil 10 mg/kg et la morphine 5mg/kg, réduit le nombre des cellules (NK) chez les animaux stressés (p= 0.03). L'effet de cette combinaison, est différent statistiquement de celui observé chez les animaux stressés et traités séparément au flumazénil et/ou à la morphine. Le traitement aux combinaisons du flumazénil 5mg/kg, 10mg/kg et la morphine 5mg/kg, rétablit le taux de base des cellules NK chez les animaux non stressés, puisque l'effet de ces combinaisons est statistiquement significatif comparé à celui observé chez les animaux non stressés et traités au flumazénil 5mg/kg, 10mg/kg et à la morphine 5mg/kg.

L'analyse de l'ANOVA à trois facteurs montre une interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement à la morphine et le stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK ($F(2, 96)= 12.342$; $p= 0.003$).

Ces résultats montrent une interaction des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans la régulation de la réponse des cellules NK chez les animaux soumis au stress.

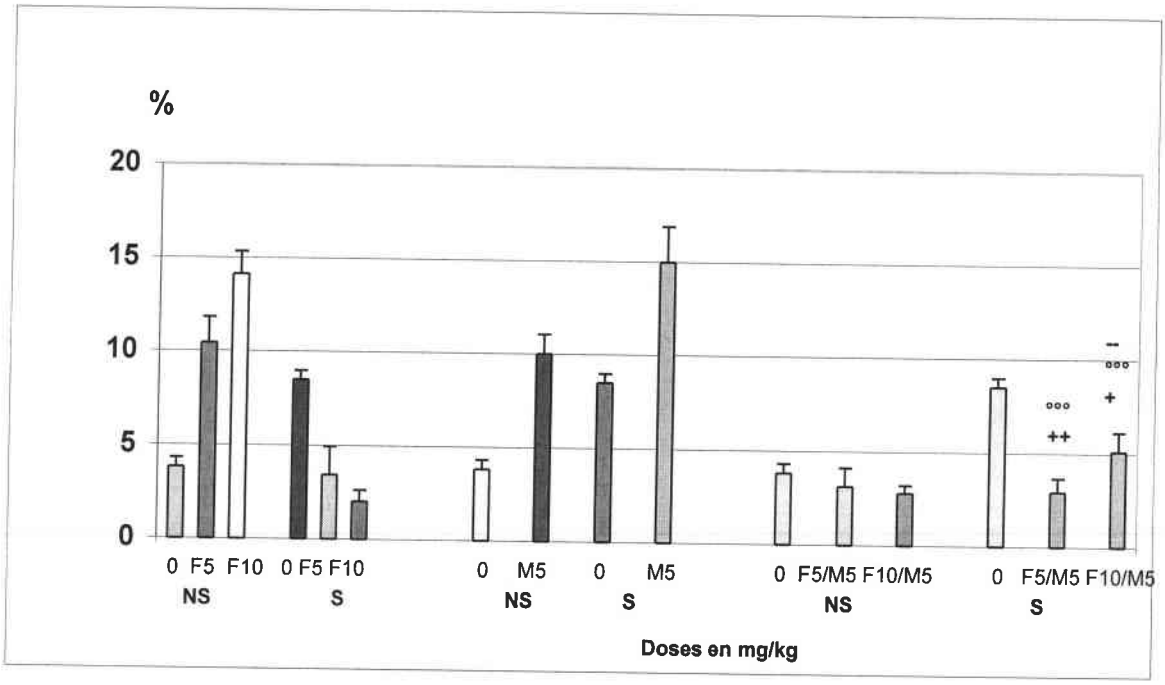


Fig. 75 Interactions des récepteurs benzodiazépiniques et opioïdes dans les perturbations de la réponse des cellules NK chez les souris stressées. N=9x12 lots. NS: non stressés; S: stressés. +:SF0//SF5,10/M5 ; °:SM5//SF5,10/M5; -:SF10//SF10/M5.

D. Conclusion

Nous avons noté une interaction entre le prétraitement au flumazénil, le traitement à la morphine et le stress uniquement vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK chez les animaux stressés. Ainsi, nous pouvons proposer pour la première fois dans la littérature, l'implication et l'interaction des systèmes opioïdes et benzodiazépiniques dans les effets immunomodulateurs du stress vis à vis de la régulation de la réponse des cellules NK.

Applications

Partie. VI

Détermination des propriétés pharmacologiques de certains médicaments homéopathiques d'origines animale et végétale vis à vis des perturbations comportementale, gastrique et immunitaire induites par le stress.

A. But du travail

En homéopathie, la recherche clinique a pour but de mettre en évidence l'efficacité des médicaments, particulièrement celle de la dilution infinitésimale, qui n'est que l'un des aspects de l'homéopathie, mais sans doute le plus caractéristique, constitue une véritable énigme au regard de nos connaissances physiques et chimiques les plus élémentaires.

Les banques de données bibliographiques disposent de nombreux articles concernant la recherche en homéopathie, dont quelques rares articles ont traité la variable immunitaire, mais aucun travail publié ne s'est intéressé actuellement à étudier les propriétés pharmacologiques de dilutions d'*Atropa belladonna* L., de *Gelsemium sempervirens* L. et du *Poumon histamine* simultanément sur le comportement, l'immunité cellulaire et sur l'état de la muqueuse gastrique chez la souris en absence et en présence du stress.

C'est pourquoi notre objectif a été de déterminer les éventuels effets de ces médicaments homéopathiques d'origine animale (*P. histamine*) et d'origine végétale (*A. belladonna* L., *G. sempervirens* L.) sur les réponses étudiées, et par conséquent, déterminer les propriétés pharmacologiques des dilutions de ces différents produits par rapport aux altérations induites par le stress expérimental chez l'animal.

B. Matériels et méthodes

- Recherche des propriétés pharmacologiques de dilutions d'*Atropa belladonna*. L., du *Gelsemium sempervirens*. L., du *Poumon histamine* et de *l'Histaminum* vis à vis des altérations induites par le stress.

Les médicaments homéopathiques ont été préparés aux laboratoires BOIRON (IFRH, Lyon), par dilution au centième selon la technique dite « Hahnemanienne ». La teinture mère des produits étudiés a été diluée au 1/100ème dans de l'alcool 90°, pour obtenir les dilutions 5 CH, 9 CH, 15 CH et 30 CH. Entre chaque opération de dilution, le flacon est fortement agité, c'est ce qu'on appelle « la dynamisation » (voir Fig. 76).

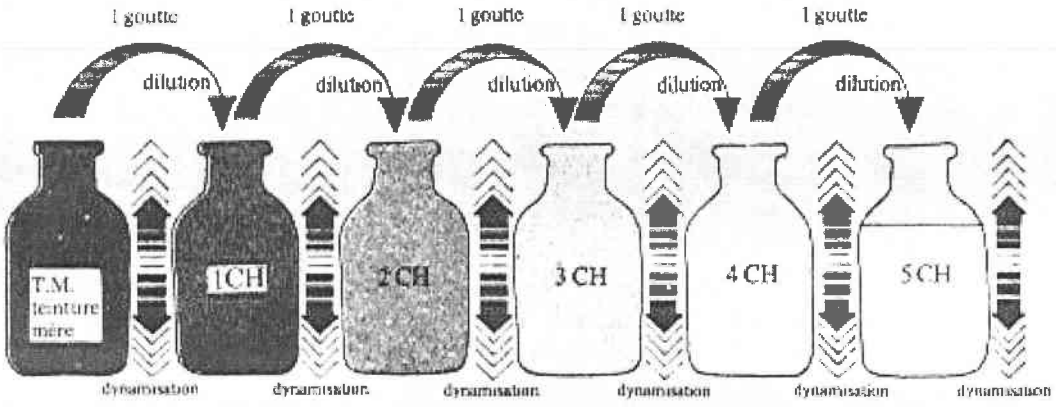


Fig. 76 Schéma des dilutions Hahnemaniennes

On administre ces médicaments homéopathiques par voie i.p. 30 min avant l'application du stress (voir procédure du stress, Partie.I). Immédiatement après l'application du stress, le comportement général des animaux a été étudié par le biais du test de la chambre claire/obscure et le test de l'escalier (voir Partie.I). 24 h après le stress, le sang et l'estomac ont été prélevé pour réaliser les études immunologiques et gastriques (voir Partie. I).

1. *Atropa belladonna.* L

1-1. Origine et description

La Belladone, plante de la famille des solanacées à laquelle appartient aussi la pomme de terre, était utilisée au moyen-âge par les magiciens, les empoisonneurs et les fabricants de produits de beauté car la plante provoque une dilatation pupillaire qui donnerait au regard de la profondeur, d'ou son nom de Belladonna (belle dame).

1-2. Pharmacologie et utilisation clinique

Elle est prescrite très empiriquement comme sédatif, anti-épileptique et anti-cancéreux. Elle contient surtout des alcaloïdes à action parasympathicolytique et en particulier l'atropine. La teinture mère est préparée à partir de la plante entière fleurie, la majorité des principes actifs étant contenus dans les feuilles. De nos jours l'atropine est surtout utilisée comme antispasmodique, à fortes doses elle avait été proposée comme un traitement de la maladie de Parkinson (D'après Deniker P, 1987). Ce produit est aussi utilisé dans les rhinopharyngites, angines, congestions céphaliques et pour tous les syndromes inflammatoires et fébriles et dans les spasmes des organes creux.

2. *Gelsemium sempervirens.* L

2-1. Origine et description

Le jasmin jaune, arbuste grimpant de la famille des loganiacées, utilisée comme plante ornementale pour son feuillage toujours vert, ses fleurs jaunes décoratives et odorantes, le Gelsemium fut employé pour ses propriétés médicinales comme fébrifuge, antispasmodique et antinévralgique, anti-hypertenseur depuis la fin du siècle dernier.

La teinture-mère est essentiellement préparée à partir de la racine de la plante : son absorption se révèle toxique pour des doses supérieures à 2 grammes. L'étude de sa composition chimique a permis d'identifier en plus de la résine, des lipides et des stérols, trois alcaloïdes à configuration chimique de type indolique qui en sont les véritables principes actifs : la gelsémine, la sempervirine et la gelsemicine.

2-2. Pharmacologie et utilisation clinique

- *La gelsémine* : principal alcaloïde de la plante, retrouvé dans les fleurs et les racines. La gelsémine interfère principalement avec la transmission cholinergiques des récepteurs nicotiniques et de façon plus modérée, avec celle des récepteurs muscariniques. Au niveau du SNC elle est responsable de l'effet sédatif avec somnolence et torpeur, par inhibition des récepteurs nicotiniques centraux.

- *La sempervirine*, plus toxique que la gelsemine est présente dans les racines; elle a une action convulsivante.

- *La gelsemicine* enfin, très toxique et mal connue, n'existe qu'à dose infime dans la plante. Selon les données toxicologiques et pharmacologiques, ce produit est prescrit pour la grippe avec tous ses symptômes : la congestion céphalique, les courbatures, les tremblements et les états fébriles adynamiques et aussi dans les paralysies virales, poliomyélite etc. Cependant, ce produit est utilisé selon les données cliniques, surtout pour le trac et le stress (tremblements, troubles de mémoire etc.), l'insomnie , les céphalées et les migraines.

3. *Poumon histamine*

3-1. Origine et description

Poumon histamine est préparé à partir du poumon de cobaye sacrifié au cours d'un choc anaphylactique provoqué artificiellement par l'ovalbumine. Ce produit contient de nombreux médiateurs de l'allergie et de l'inflammation : histamine, leucotriène….etc.

3-2. Pharmacologie

Les études cliniques ont montré que *Poumon histamine* était indiqué dans la régulation des mécanismes de la réaction allergique et surtout pour les voies respiratoires. Les travaux de recherche expérimentale ont confirmé l'action des hautes dilutions de *Poumon histamine* sur le mécanisme de la réaction allergique, en particulier sur la modulation de l'activation de la dégranulation des basophiles humains. Ces études ont

démontré que l'activité expérimentale de *Poumon histamine* est supérieure à l'Histamine seule et ceci est liée à la composition très complexe du produit.

3-3. Indicationss cliniques

- Allergies des voies respiratoires : asthme, rhinite allergique.
- Allergies cutanées.
- Œdème de Quincke.

4. *Histaminum*

Ce produit est préparé par dilutions de chlorhydrate d'histamine. Il est surtout utilisé pour des réactions allergiques cutanées, mais le Poumon histamine reste le produit le plus employé dans le domaine de l'allergie, même dans les indications cutanées, en raison de son mode de préparation plus traditionnel.

*N.B. Les différentes données sur ces quatres produits : A. belladonna L., G. sempervirens L., P.histamine et Histaminum, sont citées dans M*atière médicale homéopathique, 2ème édition (Boiron), 1997.

C. Résultats

1. Détermination des propriétés pharmacologiques des dilutions d'*Atropa belladonna*. L., du *Gelsemium sempervirens*. L. et du *Poumon histamine* vis à vis des perturbations induites par le stress.

1-1. Effets pharmacologiques des dilutions de *Atropa belladonna* L., du *Gelsemium sempervirens* L. et du *Poumon histamine* sur le comportement général des animaux stressés (Voir Partie. I pour les paramètres comportementaux)

1-1-1. Test de la chambre claire/obscure

1-1-1-1. Atropa belladonna L.

a) Transitions

Comme le montre la Fig. 77, le traitement des animaux stressés par *Atropa belladonna*, 9 et 15 CH, induit une augmentation significative du nombre des transitions chez les animaux stressés (respectivement, p= 0.0008, p= 0.0001, p=0.0001) par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9%. L'effet de la dilution 5 CH n'est pas différent statistiquement de celui observé, à la même dilution chez les animaux non stressés.

Le traitement par *Atropa belladonna* 15 CH, engendre par contre une réduction du nombre des transitions effectuées par les animaux non stressés (p= 0.04).

ANOVA à deux facteurs : - Effet du stress: F(1, 55)= 21.432; p= 0.0001.

- Effet du traitement: F(3, 55)= 5.740 ; p= 0.0017.

- Interaction : F(3, 55)= 11.373 ; p= 0.0001.

Ces résultats laisseraient supposer que *Atropa belladonna*, inverse les effets du stress vis à vis du nombre des transitions effectuées par les animaux dans le test de la chambre clair/obscure, particulièrement après un traitement aux dilutions 9 et 15 CH.

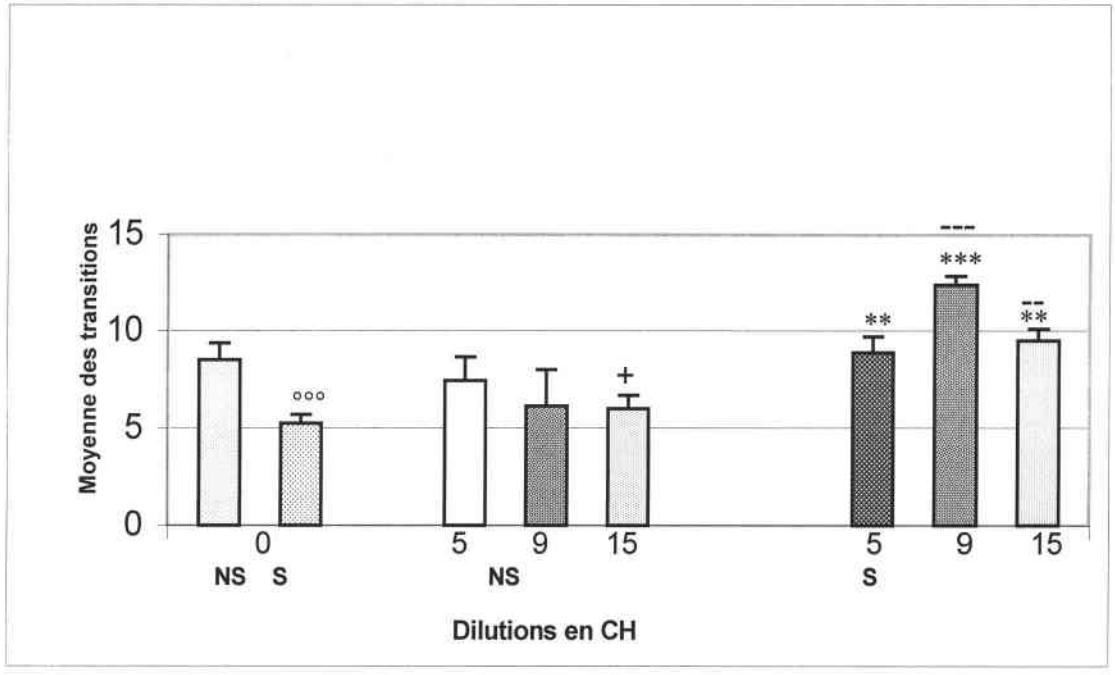


Fig. 77 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des transitions effectuées par les souris stressées dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots.
CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS: non stressés; S: stressés.
°: NS0/S0 ; +:NS0/NSBel15 ; *: S0/SBel5,9 et15 CH.

b) Temps passé dans le compartiment clair

Les résultats de la Fig. 78 montrent que le traitement par *Atropa belladonna* 9, 15 et 30 CH, diminue le temps passé par les animaux stressés dans le compartiment clair (respectivement, p= 0.0001; p= 0.0001; p= 0.0001) comparé aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs :- Effet du stress : F(1, 51)= 25.379; p= 0.0001.

- Effet du traitement: F(3, 51)= 2.273; p= 0.09.

- Interaction :F(3, 51)= 10.048 ; p= 0.0001.

Comme c'est le cas pour les transitions, on pourrait supposer que les dilutions de *Atropa belladonna* 5 et 15 CH, inversent les effets négatifs du stress sur le temps passé dans le compartiment clair.

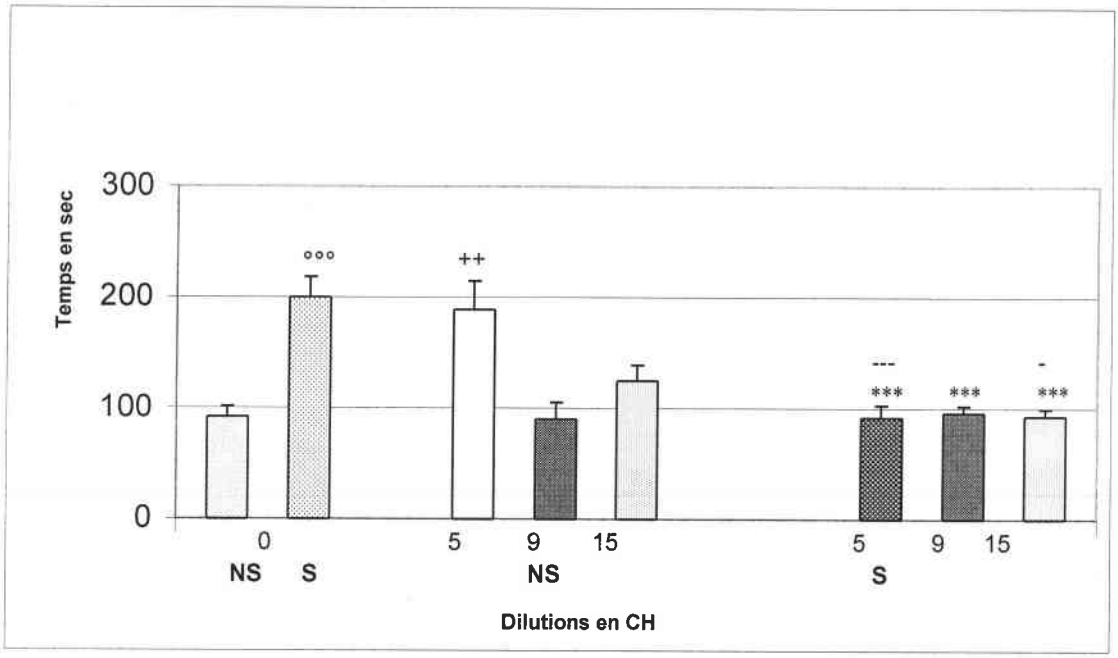


Fig. 78 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le temps passé dans le compartiment clair par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots.
NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes.
° :NS0/S0; +:NS0/NSBel5; *:S0/SBel5,9,15 CH.

c) Redressements (Fig. 79)

Nous avons observé aussi que le traitement par toutes les dilutions de *Atropa belladonna*, réduit le nombre des redressements effectués par les animaux non stressés (respectivement, p= 0.039, p= 0.009, p= 0.0001). Nous n'avons pas noté de variation statistiquement significative du nombre des redressements chez les animaux stressés.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 54)= 15.489; p= 0.0002.

- Effet du traitement: F(3, 54)= 4.414; p= 0.007.

- Interaction :F(3, 55)= 11.373; p= 0.01.

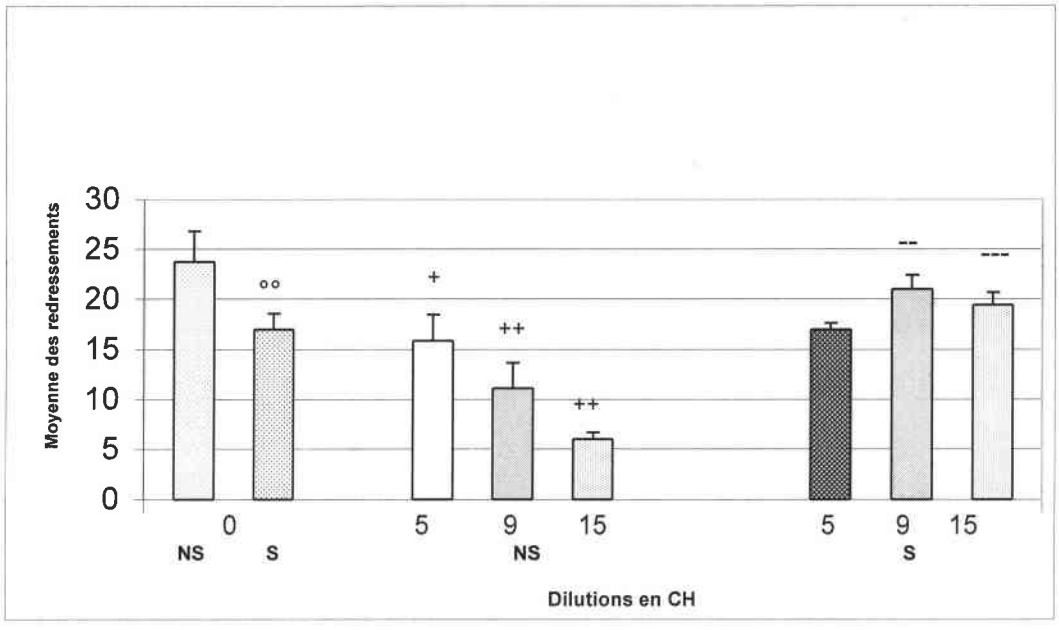


Fig. 79 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots.
NS: non stressés; S: stressés. CH : Centésimales Hahnemanniennes
°: NS0/S0; +: NS0/NSBel5,9 et 15 CH; -: NS Bel9 et 15 CH/S Bel9 et 15 CH.

1-1-1-2. Poumon histamine

a) Transitions

Comme le montre la Fig. 80, le traitement par *Poumon histamine* 5 et 15 CH, augmente le nombre des transitions effectuées par les animaux stressés (respectivement, p=0.003 ; p= 0.0025), mais l'effet de ces dilutions ne varie pas statistiquement chez les animaux stressés par rapport à l'effet de ces mêmes dilutions chez les animaux non stressés. Le nombre des transitions des animaux non stressés et traités par *Poumon histamine* à toutes les dilutions, n'a pas montré de variation statistiquement significative.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 54)= 0.118; p= 0.732.

- Effet du traitement: F(3, 54)= 2.174; p= 0.101.

- Interaction :F(3, 54)= 5.879; p= 0.0015.

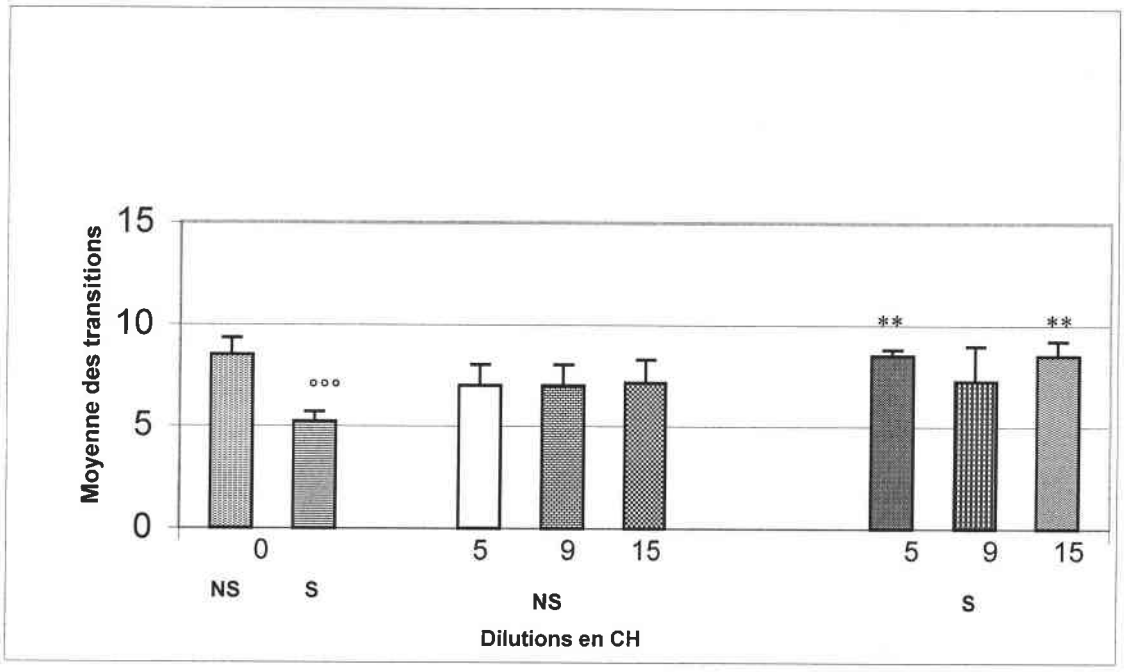


Fig. 80 Effet du *Poumon histamine* sur le nombre des transitions effectuées par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes. °: NS0/S0. *: S0/S P. his 5 et 15 CH.

b)Temps passé dans le compartiment clair

Les résultats de la Fig. 81 montrent que le traitement des animaux stressés par *Poumon histamine* 5, 9 et 15 CH, réduit le temps passé dans le compartiment clair (respectivement, p= 0.0001 ; p=0.0001 ; p= 0.0001). Nous n'avons pas noté de variation significative de ce paramètre chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 51)= 31.239; p= 0.0001.

- Effet du traitement: F(3, 51)= 1.947 ; p= 0.133.

- Interaction :F(3, 51)= 1.940; p= 0.134.

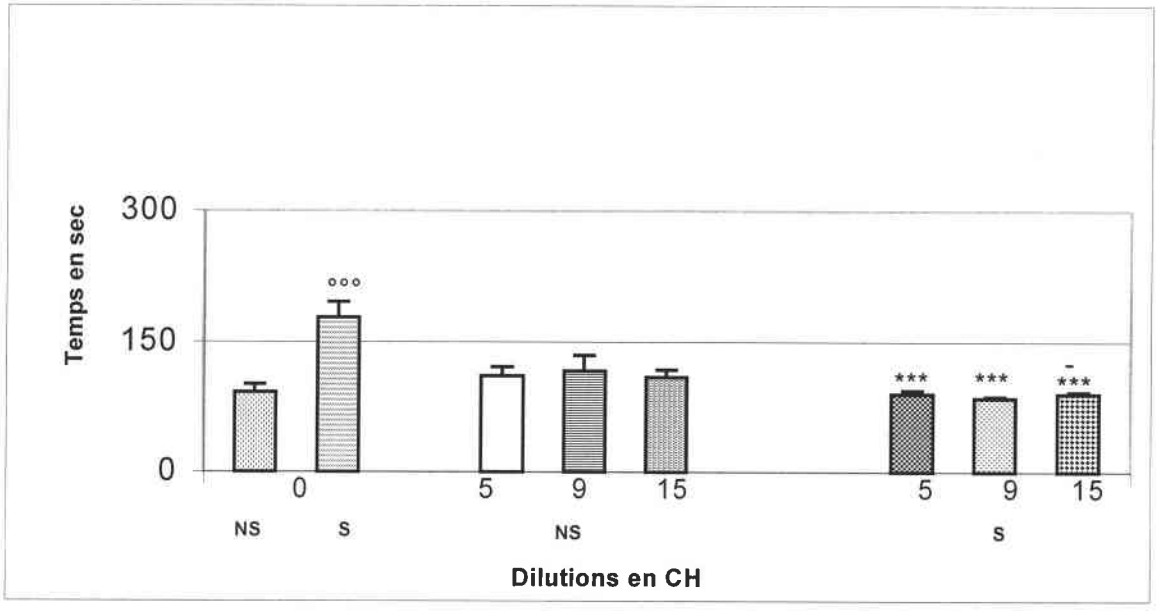


Fig. 81 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le temps passé dans le compartiment clair par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS: non stressés; S: stressés. °: NS0/S0, *:S0/SP.His5,9,15 CH; -: NSP.His15CH/SP.His15CH.

c) Redressements

La Fig. 82 montre que le traitement des animaux non stressés à toutes les dilutions de *Poumon histamine*, engendre une diminution significative du nombre des redressements par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p= 0.0001 ; p= 0.04 ; p= 0.0003). Concernant les animaux stressés, le nombre des redressements diminue chez les animaux stressés et traités par toutes les dilutions, et particulièrement la dilution 9 CH.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 54)= 13.251; p= 0.0006.

- Effet du traitement: F(3, 54)= 9.124; p= 0.0001.

- Interaction :F(3, 54)= 6.205; p= 0.0001.

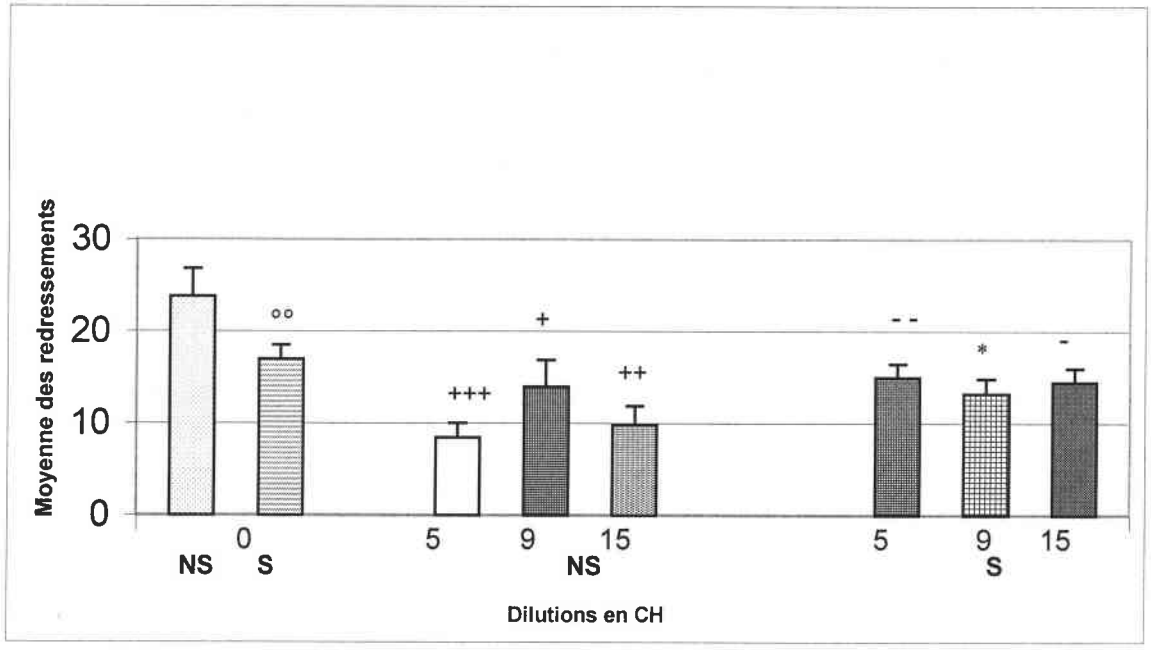


Fig. 82 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots.
CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS: non stressés; S: stressés.
°: NS0/S0, +: NS0/NSP.his 5,9,15 CH; *: S0/S,9CH; -: NSP;His5,15CH/S.P.His 5,15CH.

1-1-1-3. *Gelsemium sempervirens* L.

a) Transitions

Comme le montre la Fig. 83, le traitement par *Gelsemium sempervirens* à toutes les dilutions, augmente le nombre des transitions effectuées par les animaux stressés (respectivement, p= 0.01; p= 0.03; p= 0.04).

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(3, 54)= 0.045; p= 0.987.

- Effet du traitement: F(1, 54)= 0.109; p= 0.748.

- Interaction :F(3, 54)= 3.785; p= 0.015.

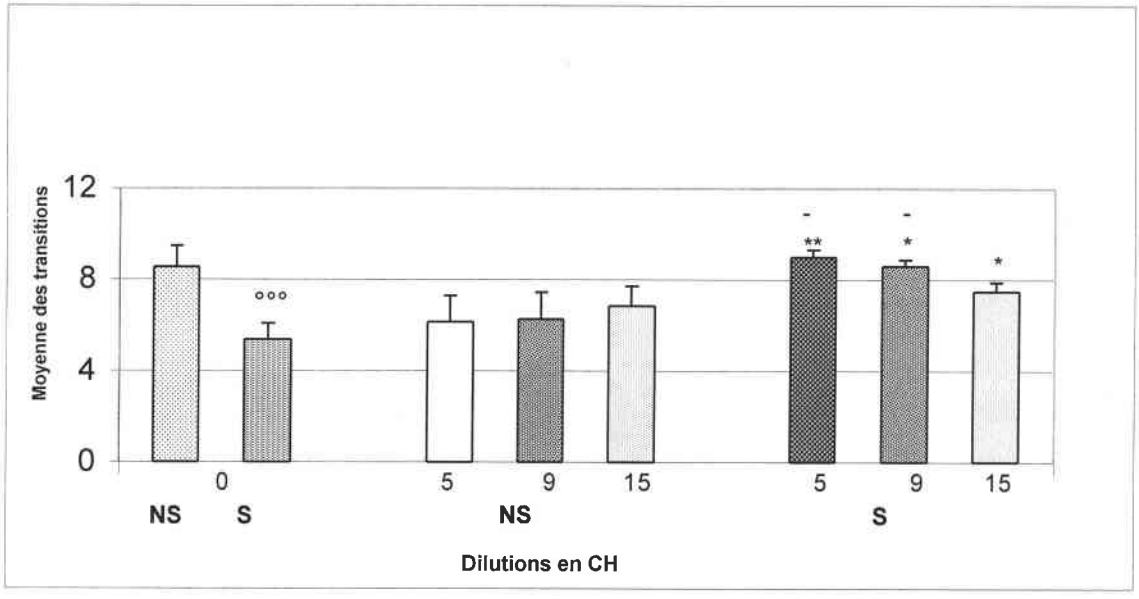


Fig. 83 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des transitions effectuées par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8lots. NS: non stressés; S: stressés.

CH: Centésimales Hahnemanniennes. °: NS0/S0; *:S0/SGel5,9,15 CH ;

-: NS Gel5, 9CH/S Gel5 et 9 CH.

b) Temps passé dans le compartiment clair

Comme le montre la Fig. 84, le traitement des animaux stressés par toutes les dilutions de *Gelsemium sempervirens*, entraîne une réduction du temps passé dans le compartiment clair (p= 0.001 ; p=0.014 ; p= 0.012) comparé aux animaux non stressés et traités à toutes les dilutions du *Gelsemium sempervirens*.

L'analyse statistique a montré que:

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 46)= 3.569; p= 0.021.

- Effet du traitement: F(1, 46)= 50.278; p= 0.0001.

- Interaction :F(3, 46)= 0.782; p= 0.509.

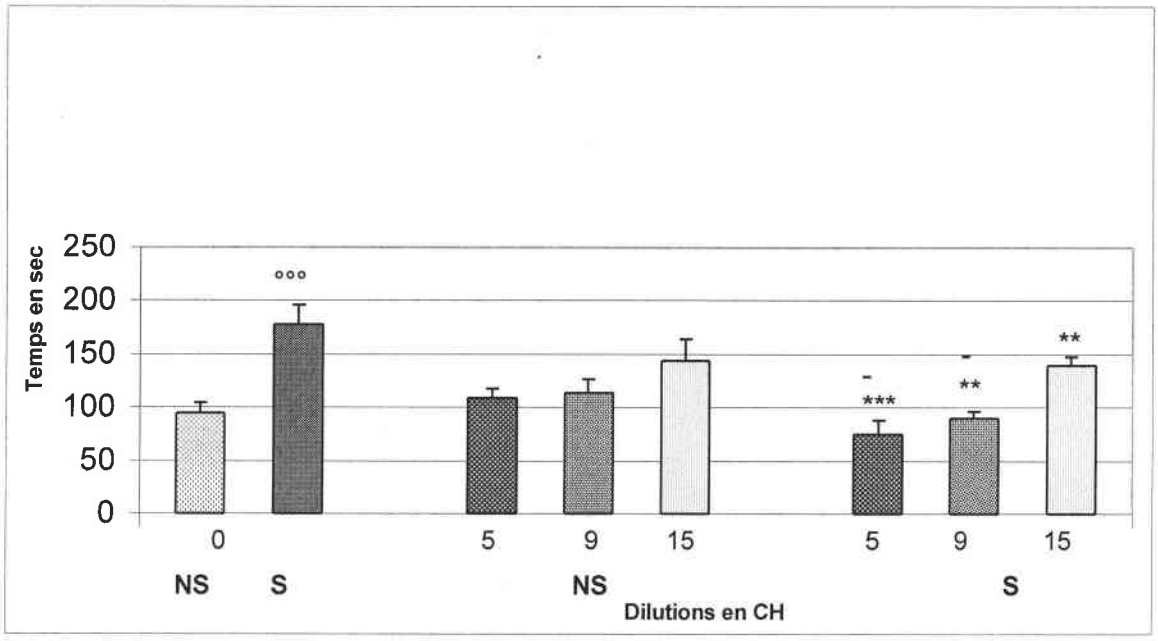


Fig. 84 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le temps passé par les souris dans le compartiment clair du test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots.
CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS: non stressés;
S: stressés. °: NS0/S0. *: S0/SGel5,9 et 15 CH ; - : NSGel 5 et 9 CH/S Gel 5 et 9 CH.

c) Redressements

La Fig. 85 montre que le traitement par *Gelsemium sempervirens* 5 et 9 CH, induit chez les animaux non stressés, une réduction du nombre des redressements effectuées par rapport aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p= 0.0001 ; p= 0.0001). Cependant, aucune variation statistiquement significative du nombre des redressements n'a été notée chez les animaux stressés et traités par *Gelsemium sempervirens* à toutes les dilutions.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs: - Effet du stress : F(1, 54)= 11.617; p= 0.0012.

- Effet du traitement: F(3, 54)= 7.893; p= 0.0002.

- Interaction :F(3, 55)= 5.792; p= 0.0017.

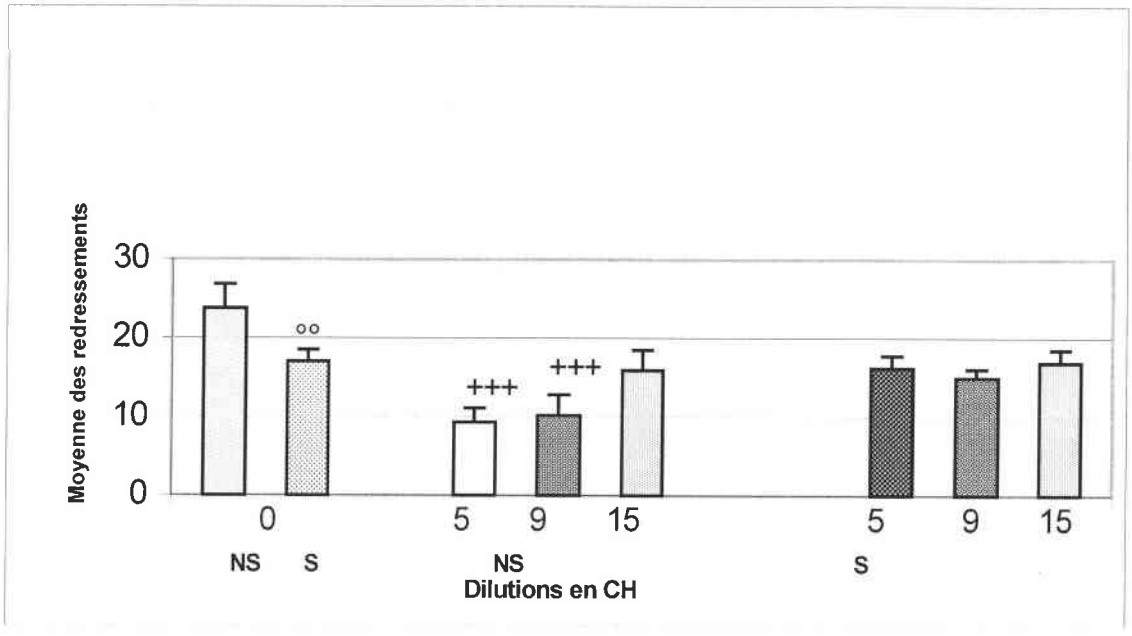


Fig. 85 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de la chambre claire/obscure. N=10x8 lots. CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS: non stressés; S: stressés.°: NS0/S0. +: NS0/ NSGel5 et 9 CH.

1-1-2. Test de l'escalier

1-1-2-1. *Atropa belladonna* L.

a) Marches montées

La Fig. 86 montre que le traitement des animaux non stressés par *Atropa belladonna* 5 et 15 CH, diminue le nombre des marches montées (respectivement, p= 0.03; p= 0.0001). Cependant la dilution 15 CH, provoque une augmentation du nombre des marches montées chez les animaux stressés (p= 0.006) comparés aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 56)= 7.944; p= 0.0067.

- Effet du traitement: F(4, 56)= 10.126; p= 0.0001.

- Interaction :F(2, 54)= 6.256; p= 0.02.

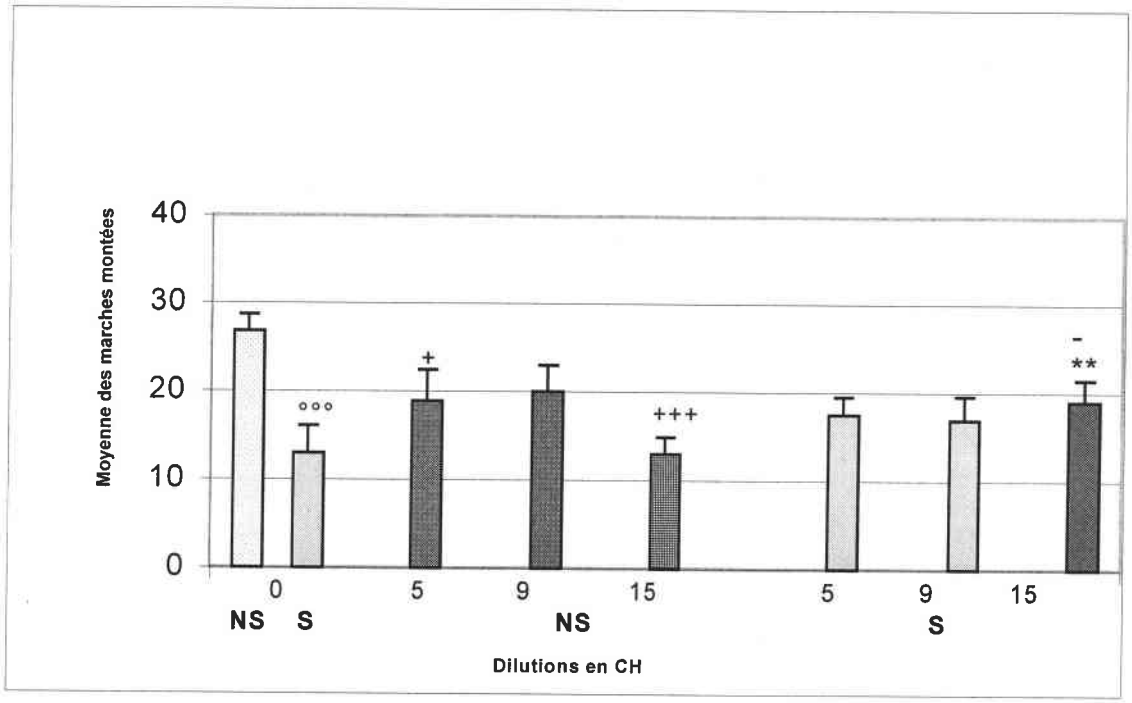


Fig. 86 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des marches montées effectuées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes. °: NS0/S0 ; +: NS0/NSBel5 et 15 CH, *: S0/SBel15 CH ; - :NSBel15CH/SBel15CH.

b) Redressements (Fig. 87)

On constate que la dilution 15 CH de *Atropa belladonna*, augmente le nombre des redressements chez les animaux stressés comparés aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 % (p= 0.008). L'effet de cette dilution n'est pas différent statistiquement de celui observé chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 52)= 0.445; p= 0.507.

- Effet du traitement: F(4, 52)= 1.834; p= 0.136.

- Interaction :F(2, 52)= 1.287; p= 0.284.

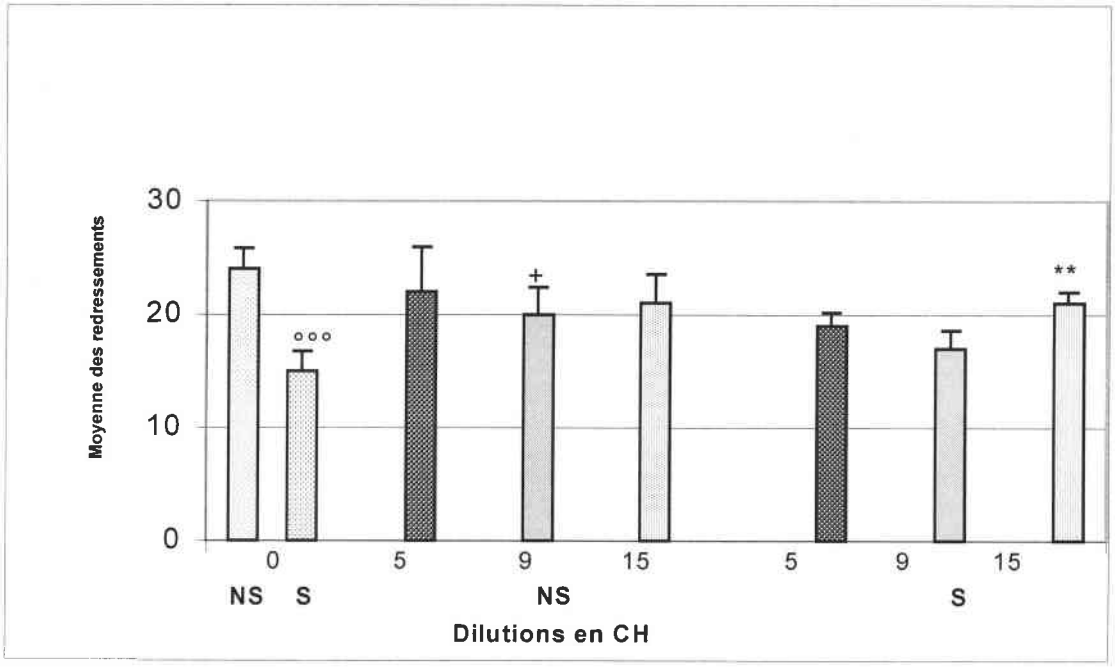


Fig. 87 Effet des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes.°: NS0/S0; +: NS0/NSBel9CH; *: S0/SBel15CH.

1-1-2-2. *Poumon histamine*

a) Marches montées

La Fig. 88 montre que le traitement par *Poumon histamine* 5, 9 et 15 CH, induit une réduction du nombre des marches montées chez les animaux non stressés (respectivement, p= 0.008 ; p= 0.0001 ; p= 0.003). Alors que le nombre des marches montées augmente après un traitement des animaux stressés aux dilutions 5 et 9 CH (respectivement, p= 0.0001 ; p= 0.0003).

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress: F(1, 54)= 12.532; p= 0.0008.

- Effet du traitement: F(4, 54)= 11.456 ; p= 0.0001.

- Interaction : F(2, 54)= 12.074 ; p= 0.005.

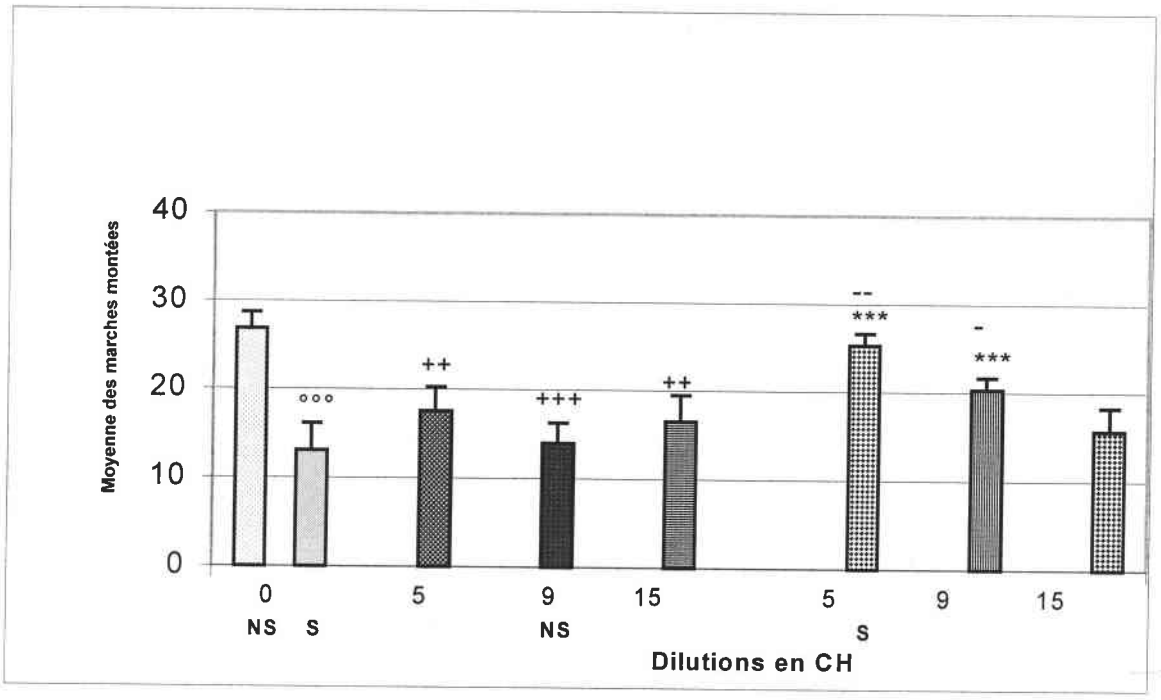


Fig. 88 Effet de *Poumon histamine* sur le nombre des marches montées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes.°: NS0/S. +:NS0/NSP.his5,9 et15CH.*: S0/SP.his 5, 9CH ; - : NS P.His5, 9CH/S P.His5, 9 CH.

b) Redressements

La Fig. 89 montre que le traitement des animaux stressés par *Poumon histamine* 5 et 9 CH, augmente le nombre des redressements comparé aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p= 0.001 ; p= 0.003).

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 52)= 0.063; p= 0.803.

- Effet du traitement: F(4, 52)= 3.540; p= 0.011.

- Interaction :F(2, 52)= 2.963; p= 0.04.

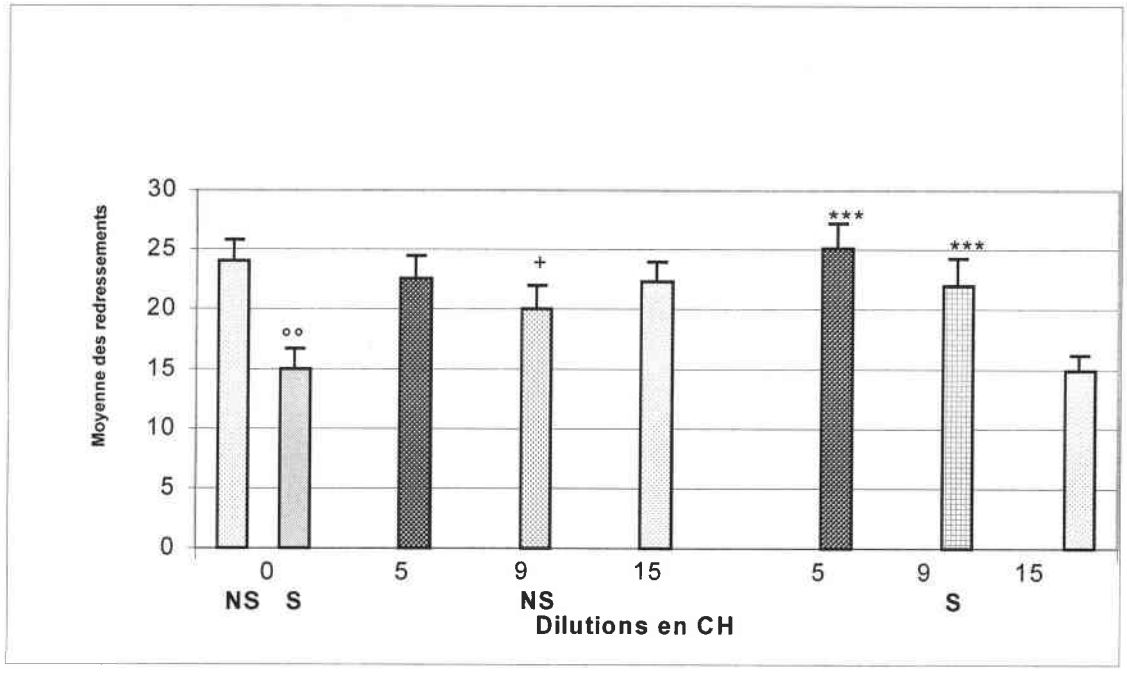


Fig. 89 Effet des dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots. NS: non stressés. S: stressés CH: Centésimales Hahnemanniennes. °:NS0/S0; +: NS0/NS P.his9; *: S0/SP.his 5 et 9 CH.

1-1-2-3. *Gelsemium sempervirens* L.

a) Marches montées

La Fig. 90 montre que le traitement des animaux non stressés par *Gelsemium sempervirens* 5 et 15 CH, provoque une réduction du nombre des marches montées (respectivement, p=0.001, p= 0.0001). Cependant, ces mêmes dilutions augmentent le nombre des marches montées des animaux stressés (respectivement, p=0.008; p=0.03), mais l'effet de ces dilutions n'est pas différent statistiquement de celui de ces mêmes dilutions chez les animaux non stressés.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 54)= 1.894; p= 0.174.

- Effet du traitement: F(4, 54)= 7.508; p= 0.0001.

- Interaction :F(2, 54)= 2.807; p= 0.069.

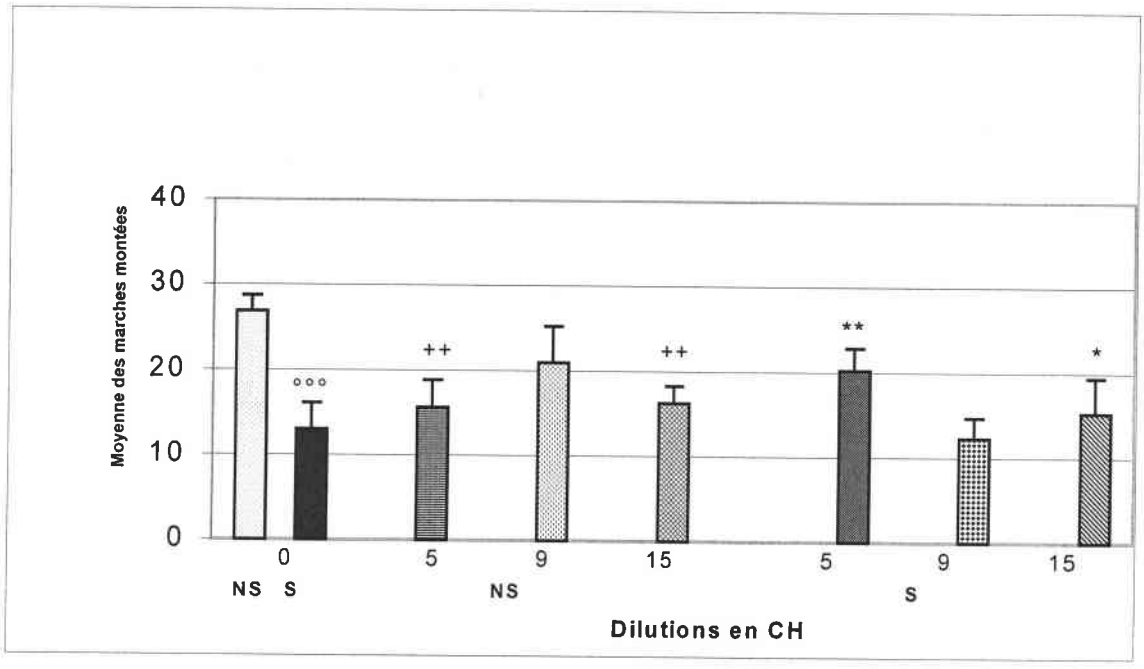


Fig. 90 Effet de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des marches montées par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8lots. NS: non stressés. S: stressés. CH: Centésimales Hahnemanniennes.°: NS0/S0; + NS0/NSGel5et 15CH;*: S0/SGel5,15 CH.

b) Redressements

La Fig. 91 montre que les dilutions *Gelsemium sempervirens* 5 et 15 CH, induisent une diminution du nombre des redressements chez les animaux non stressés (respectivement, p= 0.03 ; p= 0.025). Alors que le nombre des redressements n'a pas varié après un traitement à toutes les dilutions testées de *Gelsemium sempervirens* chez les animaux stressés.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 52)= 3.710; p= 0.059.

- Effet du traitement: F(4, 52)= 0.506; p= 0.731.

- Interaction :F(2, 52)= 5.859; p= 0.0059.

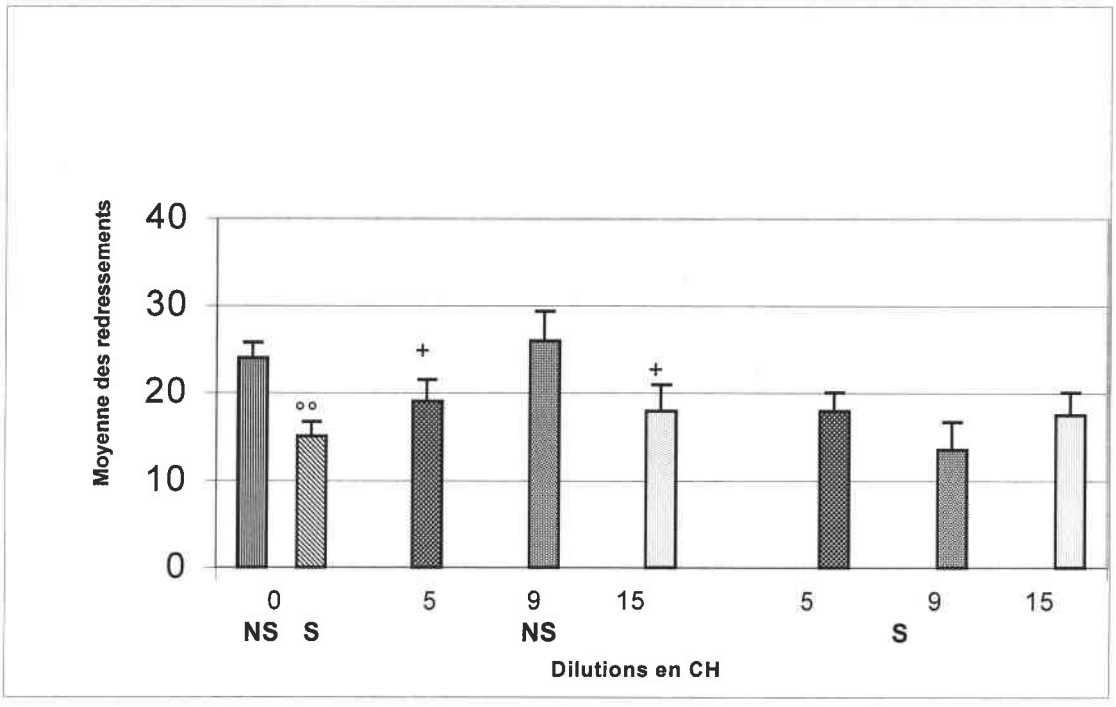


Fig. 91 Effet des dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des redressements effectués par les souris dans le test de l'escalier. N=10x8 lots.
CH: Centésimales Hahnemanniennes NS: non stressés. S: stressés.
°: NS0/S0; +: NS0/NSGel5et 15 CH.

1-2. Effets pharmacologiques des dilutions de *Atropa belladonna* L., du *Gelsemium sempervirens* L. et du *Poumon histamine* sur la valeur absolue des leucocytes chez les animaux stressés.

1-2-1. *Atropa belladonna* L.

Comme le montre le Tableau. 17, les animaux stressés et traités par *Atropa belladonna* 9 CH, présentent une légère et significative hausse du nombre des lymphocytes. Le nombre des neutrophiles et des basophiles, augmente significativement chez les stressés et traités aux dilutions 5 et 9 CH. Cependant, le nombre des monocytes augmente significativement chez les animaux stressés et traités aux dilutions 5 et 15 CH. Les résultats montrent aussi que le nombre des basophiles augmente significativement chez les animaux non stressés et traités aux dilutions 5 et 15 CH. Alors que la dilution 9 CH de ce produit induit plutôt une réduction du nombre des basophiles.

1-2-2. *Gelsemium sempervirens* L. (Tableau. 18)

Gelsemium sempervirens 15 CH, induit une importante augmentation du nombre des lymphocytes chez les animaux stressés comparés aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %. Une augmentation significative du nombre des neutrophiles a été montrée aussi chez les animaux stressés et traités aux dilutions 9 et 15 CH. Cependant, le nombre des basophiles augmente uniquement après un traitement par *Gelsemium sempervirens* 15 CH. Le traitement des animaux non stressés aux dilutions 5 et 9 CH, induit une réduction du nombre des monocytes. Concernant le nombre des basophiles, nous avons noté une réduction de leur nombre, uniquement chez les animaux non stressés et traités à la dilution 5 CH.

1-2-3. *Poumon histamine* (Tableau. 19)

Le traitement des animaux stressés par *Poumon histamine* 9 et 15 CH, entraîne une hausse du nombre des lymphocytes; le nombre des basophiles augmente considérablement chez les animaux stressés et traités à la dilution 5 CH. Une augmentation significative du nombre des neutrophiles et des monocytes a été montrée chez les animaux stressés et traités à toutes les dilutions de *Poumon histamine.* Nous avons constaté aussi chez les animaux non stressés, que la dilution 15 CH provoque, une augmentation du nombre des lymphocytes et des basophiles. Alors que la dilution 9 CH, induit une augmentation significative du nombre des neutrophiles comparé aux animaux non stressés et traités au NaCl 0.9 %.

1-3. Effets pharmacologiques des dilutions d'*Atropa belladonna* L., du *Gelsemium sempervirens* L. et du *Poumon histamine* sur l'état de la muqueuse gastrique des animaux stressés.

Comme le montre le Tableau. 20, le traitement par la dilution 9 CH de *Atropa belladonna*, protège de façon importante la muqueuse gastrique des animaux stressés comparé à des animaux stressés et traités par du NaCl 0.9 %.

Nous avons noté aussi que le traitement (particulièrement, la dilution 5 CH) des animaux stressés par toutes les dilutions du *Gelsemium sempervirens* et du *Poumon histamine*, entraîne une protection importante de la muqueuse gastrique des animaux exposés au stress, comparé aux animaux stressés et traités par du NaCl 0.9 %.

Tableau 17. Effets des dilutions de *Atropa belladonna* L. sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris.

		Lymphocytes	Neutrophiles	Basophiles	Monocytes
Groupes non stressés/traités au NaCl 0.9 %					
NS NaCl 0.9 %	Moy ± SEM % variation	2.797 ± 0.126 100 %	0.844 ± 0.039 100 %	0.370 ± 0.050 100 %	1.632 ± 0.182 100 %
Groupes stressés/traités au NaCl 0.9 %					
S NaCl 0.9 %	Moy ± SEM % variation	°° 2.012 ± 0.162 72 %	° 0.439 ± 0.026 52 %	°°° 0.064 ± 0.005 17 %	°° 1.042 ± 0.018 64 %
Groupes non stressés et traités/*Atropa belladonna* L.					
5 CH	Moy ± SEM % variation	2.600 ± 1.214 93 %	0.754 ± 0.254 89 %	+++ 0.560 ± 0.532 171 %	1.568 ± 0.189 96 %
9 CH	Moy ± SEM % variation	2.800 ± 2.023 100 %	0.852 ± 0.065 100 %	++ 0.260 ± 0.286 70 %	1.698 ± 0.062 104 %
15 CH	Moy ± SEM % variation	3.125 ± 1.265 112 %	0.956 ± 0.059 113 %	+++ 0.689 ± 0.560 186 %	1.602 ± 0.253 98 %
Groupes stressés et traités/ *Atropa belladonna* L.					
5 CH	Moy ± SEM % variation	2.284 ± 0.169 113 %	*** 1.610 ± 0.121 366 %	*** 0.111 ± 0.005 173 %	*** 1.811 ± 0.142 173 %
9 CH	Moy ± SEM % variation	* 2.509 ± 0.244 125 %	*** 1.434 ± 0.151 326 %	** 0.087 ± 0.006 136 %	1.119 ± 0.131 107 %
15 CH	Moy ± SEM % variation	* 1.509 ± 0.105 75 %	0.371 ± 0.040 84 %	0.052 ± 0.005 81 %	* 1.341 ± 0.095 129 %

N=9x8 lots. CH: Centésimales Hahnemanniennes. NS : non stressés ; S : stressés.
- NS0/S0: °°°:p< 0.001, °° : p<0.01, ° : p<0.05.
- NS0/NS Bel5,9 et15CH: +++:p< 0.001,++: p< 0.01.
- S0/S Bel5,9 et 15 CH : *** :p< 0.001, **:p< 0.01, *:p< 0.05.

Tableau 18. Effets de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris.

		Lymphocytes	Neutrophiles	Basophiles	Monocytes
Groupes non stressés/traités au NaCl 0.9 %					
NS NaCl 0.9 %	Moy ± SEM % variation	2.797 ± 0.126 100 %	0.844 ± 0.039 100 %	0.370 ± 0.050 100 %	1.632 ± 0.182 100 %
Groupes stressés/traités au NaCl 0.9 %					
S NaCl 0.9 %	Moy ± SEM % variation	°° 2.012 ± 0.162 72 %	° 0.439 ± 0.026 52 %	°°° 0.064 ± 0.005 17 %	°° 1.042 ± 0.018 64 %
Groupes non stressés et traités/*Gelsemium sempervirens* L.					
5 CH	Moy ± SEM % variation	+ 2.023 ± 0.235 72 %	 0.825 ± 0.023 97 %	++ 0.231 ± 0.031 62 %	+ 1.225 ± 0.223 75 %
9 CH	Moy ± SEM % variation	+ 2.265 ± 0.285 80 %	 0.964 ± 0.059 114 %	 0.352 ± 0.059 95 %	++ 0.986 ± 0.060 60 %
15 CH	Moy ± SEM % variation	 2.850 ± 0.126 101 %	 0.758 ± 0.063 89 %	 0.380 ± 0.063 102 %	 1.560 ± 0.092 95 %
Groupes stressés et traités/*Gelsemium sempervirens* L.					
5 CH	Moy ± SEM % variation	 2.341 ± 0.271 116 %	 0.380± 0.060 86 %	 0.057 ± 0.004 89 %	 0.870 ± 0.087 84 %
9 CH	Moy ± SEM % variation	 1.933 ± 0.095 96 %	*** 1.606 ± 0.116 366 %	 0.066 ± 0.008 103 %	 1.135 ± 0.158 109 %
15 CH	Moy ± SEM % variation	** 2.592 ± 0.148 129 %	*** 0.820 ± 0.053 187 %	*** 0.137 ± 0.017 214 %	 1.170 ± 0.037 112 %

N=9x8 lots. Centésimales Hahnemanniennes.. NS : non stressés ; S : stressés.
- NS0/S0: °°°:p< 0.001, °° : p<0.01, ° : p<0.05.
- NS0/NS Gel 5 et 9 CH:++: p< 0.01, + : p<0.05.
- S0/S Gel 9 et 15 CH : *** :p< 0.001, **:p< 0.01.

Tableau 19. Effets du *Poumon histamine* sur le nombre des sous populations leucocytaires chez la souris.

		Lymphocytes	Neutrophiles	Basophiles	Monocytes
Groupes non stressés/traités au NaCl 0.9 %					
NS NaCl 0.9 %	Moy ± SEM	2.797 ± 0.126	0.844 ± 0.039	0.370 ± 0.050	1.632 ± 0.182
	% variation	100 %	100 %	100 %	100 %
Groupes stressés/traités au NaCl 0.9 %					
S NaCl 0.9 %		°°	°	°°°	°°
	Moy ± SEM	2.012 ± 0.162	0.439 ± 0.026	0.064 ± 0.005	1.042 ± 0.018
	% variation	72 %	52 %	17 %	64 %
Groupes non stressés et traités/*Poumon histamine*					
5 CH	Moy ± SEM	2.701 ± 0.205	0.952 ± 0.052	0.456 ± 0.056	1.758 ± 0.189
	% variation	96 %	112 %	123 %	107 %
9 CH			++		
	Moy ± SEM	2.986 ± 0.274	1.231 ± 0.265	0.321 ± 0.052	1.702 ± 0.160
	% variation	106 %	145 %	86 %	104 %
15 CH		++		++	
	Moy ± SEM	3.902 ± 0.256	1.023 ± 0.201	0.507 ± 0.026	1.689 ± 0.231
	% variation	139 %	121 %	137 %	103 %
Groupes stressés et traités/*Poumon histamine.*					
5 CH			***	***	*
	Moy ± SEM	2.385 ± 0.208	1.857 ± 0.226	0.176 ± 0.016	1.414 ± 0.171
	% variation	118 %	423 %	275 %	135 %
9 CH		*	***		**
	Moy ± SEM	2.598 ± 0.229	3.130 ± 1.612	0.078 ± 0.004	1.607 ± 0.174
	% variation	129 %	712 %	122 %	154 %
15 CH		**	***		***
	Moy ± SEM	3.661 ± 0.148	1.010 ± 0.045	0.071 ± 0.009	1.600 ± 0.131
	% variation	182 %	230 %	110 %	153 %

N=9x8 lots. CH: Centésimales Hahnemaniennes. NS : non stressés ; S : stressés.
- NS0/S0: °°°:p< 0.001, °° : p<0.01, °: p<0.05.
- NS0/NS P. His 9 et15CH: ++: p< 0.01.
- S0/S P.His 5,9 et 15 CH : *** :p< 0.001, **:p< 0.01, *:p< 0.05.

Tableau 20. Effets de *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. et *Poumon histamine* sur la réponse gastrique chez la souris.

	Nombre d'animaux	Moyenne de l'inflammation ± SEM	p<	Protection (%)
Groupes non stressés/traités au NaCl 0.9 %				
NS NaCl 0.9 %	5	2.677 ± 0.211	///	///
Groupes stressés/traités au NaCl 0.9 %				
S NaCl 0.9 %	5	8.111 ± 0.511	0.001	///
Groupes non stressés et traités/*Atropa belladonna* L.				
5 CH	5	2.250 ± 2.020	0.03	16
9 CH	5	2.020 ± 1.050	0.004	21
15 CH	5	4.023 ± 1.022	0.01	Aucune protection
Groupes stressés et traités/*Atropa belladonna* L.				
9 CH	5	1.532 ± 0.417	0.001	81
15 CH	5	9.100 ± 0.231	NS	Aucune protection
Groupes non stressés et traités/*Gelsemium sempervirens* L.				
5 CH	5	3.560 ± 1.036	NS	Aucune protection
9 CH	5	2.050 ± 0.206	0.005	23
15 CH	5	2.560 ± 1.086	NS	Aucune protection
Groupes stressés et traités/*Gelsemium sempervirens* L.				
5 CH	5	2.667 ± 0.546	0.001	67
9 CH	5	5.047 ± 0.801	0.01	38
15 CH	5	3.500 ± 0.128	0.001	57
Groupes non stressés et traités/*Poumon histamine*				
5 CH	5	3.677 ± 2.030	0.01	Aucune protection
9 CH	5	4.266 ± 1.230	0.001	Aucune protection
15 CH	5	3.023 ± 2.120	0.03	Aucune protection
Groupes stressés et traités/*Poumon histamine*				
5 CH	5	2.500 ± 0.289	0.001	69
9 CH	5	4.050 ± 1.470	0.01	50
15 CH	5	4.020 ± 1.230	0.01	50

N=5x19 lots. CH:Centésimales Hahnemaniennes. NS : non significatif. NS : non stressés ; S : stressés.
Le taux de protection (%) = a-b/a x 100.
a : moyenne de la longueur des lésions de la muqueuse gastrique chez les animaux traités au NaCl 0.9 %.
b : moyenne de la longueur des lésions de la muqueuse gastrique chez les animaux traités avec les produits étudiés.

2. Détermination des effets pharmacologiques des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L., du *Poumon histamine* et de *l'Histaminum* sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez la souris.

2-1. *Gelsemium sempervirens*

2-1-1. Les lymphocytes T CD4

Comme le montre la Fig. 92 *Gelsemium sempervirens* 9 et 15 CH, augmentent le nombre des lymphocytes TCD4 chez les animaux stressés (respectivement, p=0.022 ; p=0.007), l'effet de ces dilutions n'est pas différent statistiquement de celui de ces mêmes dilutions chez les animaux non stressés. Cependant, le traitement des animaux non stressés à toutes les dilutions du produit, provoque une réduction du nombre des cellules T CD4 (respectivement, p= 0.017; p= 0.015 ; p= 0.0004).

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 48)= 15.508; p= 0.0003.

- Effet du traitement: F(3, 48)= 2.254; p= 0.094.

- Interaction :F(3, 48)= 6.006; p= 0.0015.

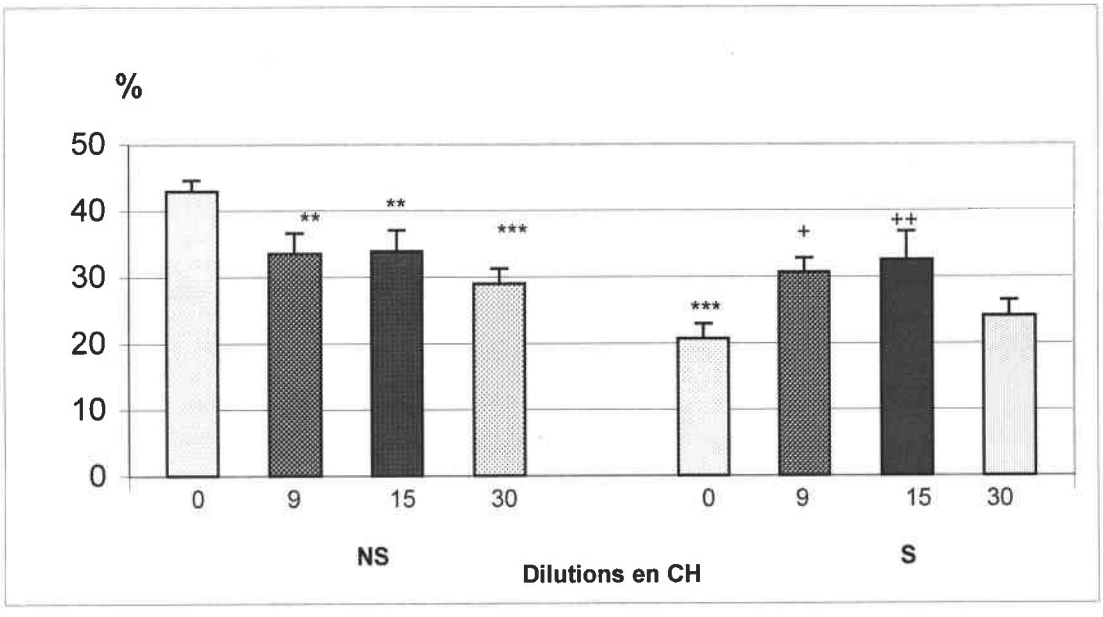


Fig. 92 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L . sur le nombre des lymphocytes T CD4 chez la souris. N=9x8. NS: non stressés. S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes.*:NS0/NSGel9,15,30; S0; +:S0/SGel9,15.

2-1-2. les lymphocytes T CD8 (Fig. 93)

Les dilutions de *Gelsemium sempervirens* 15 et 30 CH, induisent une réduction du nombre des T CD8 chez les animaux stressés comparés aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 % (respectivement, p=0.004 ; p= 0.003). Aucune variation statistiquement significative du nombre des T CD4 n' a été notée chez les animaux non stressés.

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 46)= 4.219; p= 0.045.

- Effet du traitement: F(3, 46)= 5.246; p= 0.0033.

- Interaction :F(3, 46)=0.803; p= 0.498.

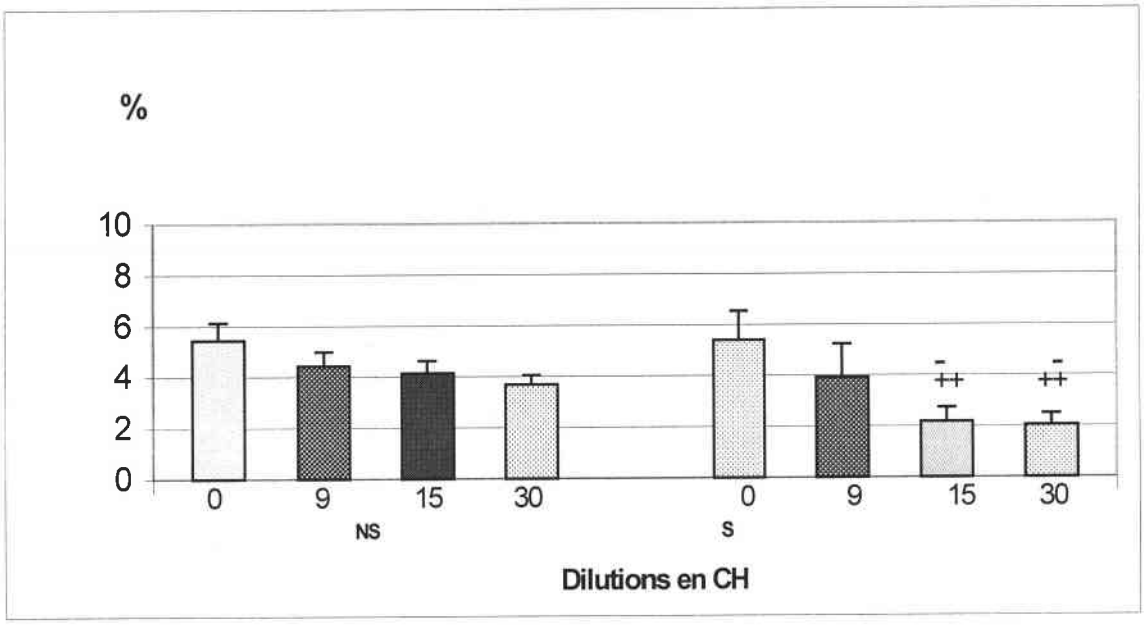


Fig. 93 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des lymphocytes T CD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: dilutions centésimales hahnemaniennes. +: S0/SGel15 et 30 ; -: NSGel15,30/SGel15,30.

2-13. Les cellules NK (Fig. 94)

On note que les dilutions de *Gelsemium sempervirens* 15 et 30 CH, provoquent une augmentation significative du nombre des cellules NK (respectivement, p= 0.0006 ; p=0.03) chez les animaux stressés. Alors que 9 CH a plutôt tendance à inverser les effets du stress en diminuant le nombre des cellules NK (p=0.025). L'effet de cette dilution est différent significativement de celui de cette même dilution chez les animaux

non stressés. Cependant la même dilution 9 CH, chez les animaux non stressés, a plutôt tendance à augmenter de façon importante le nombre des cellules NK chez les animaux non stressés (p= 0.0001).

L'analyse statistique a montré que

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 46)= 2.841; p= 0.098.

- Effet du traitement: F(3, 46)= 7.563; p= 0.0003.

- Interaction :F(3, 46)= 21.309; p= 0.0001.

Par conséquent, on pourrait supposer que *Gelsemium sempervirens* agit différemment en fonction des dilutions. Ces résultats montrent d'une part, que les faibles dilutions (9 CH), inversent les effets du stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK. D'autre part les fortes dilutions (15 et 30 CH), renforcent les effets immunodépresseurs du stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

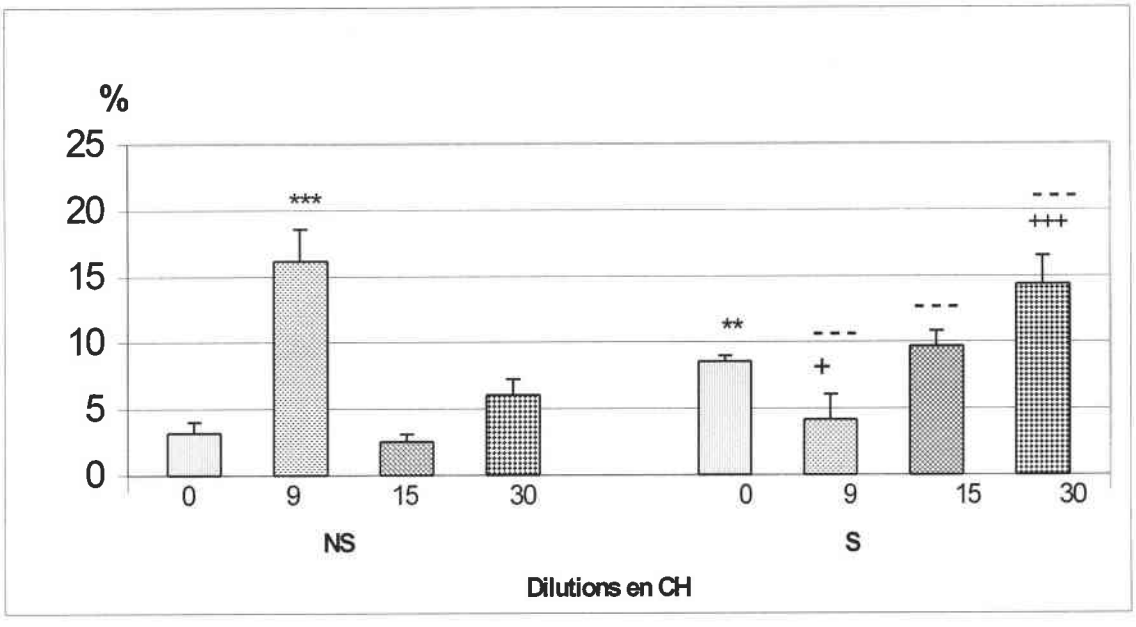


Fig. 94 Les effets des hautes dilutions de *Gelsemium sempervirens* L. sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés, S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSGel9, S0; +: S0/SGel9,15 et 30; -: NS Gel9,15,30/SGel9,15,30 CH.

2-2. *Poumon histamine*

2-2-1. Les lymphocytes T CD4 (Fig. 95)

Le traitement à toutes les dilutions de *Poumon histamine*, augmente le nombre des cellules TCD4 chez les animaux stressés (respectivement, p=0.009; p=0.006; p=0.0018) comparé aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %.

Cependant le nombre des T CD4 chez les animaux non stressés, a plutôt tendance à diminuer après un traitement à toutes les dilutions 9, 15 et 30 CH (respectivement, p=0.013; p= 0.0006; p= 0.0002).

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress: F(1, 45)= 5.773; p= 0.020.

- Effet du traitement: F(3, 45)= 0.201; p= 0.895.

- Interaction :F(3, 45)= 10.947; p= 0.0001.

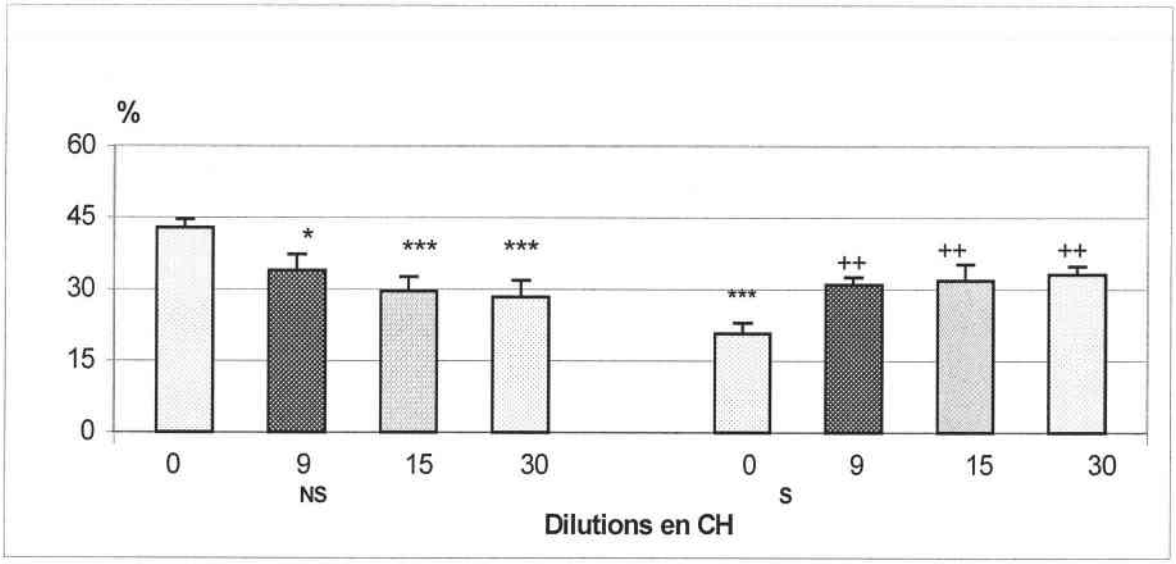


Fig. 95 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des lymphocytes T CD4 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes.*: NS0/NSPhis9,15,30 CH, S0 ; + : S0/S P.his,15 et 30 CH.

2-2-2. Les lymphocytes T CD8

Les résultats de la Fig. 96 montrent que *Poumon histamine* 15 CH, induit une réduction du nombre des lymphocytes T CD8 à la fois chez les animaux stressés (p=0.002) et non stressés (p= 0.04).

ANOVA à deux facteurs: - Effet du stress : F(3, 47)= 6.034; p= 0.0015.

- Effet du traitement: F(1, 47)= 0.031; p= 0.861.

- Interaction :F(3, 47)= 1.272; p= 0.294.

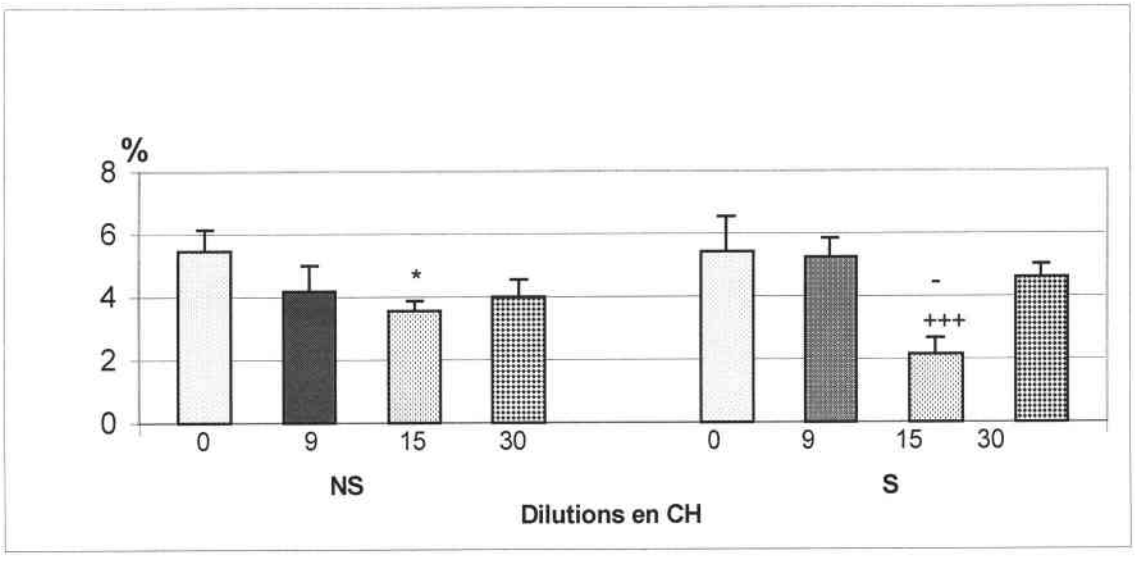


Fig. 96 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine* sur le nombre des lymphocytes T CD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSP.his15; +: S0/SP.his15; -: NSP.his15/SP.his15.

2-2-3. Les cellules NK

On constate que le traitement par *Poumon histamine* 9 CH, diminue le nombre des cellules NK (Fig. 97) (p= 0.003), l'effet de cette dilution n'est pas différent statistiquement de celui de cette même dilution chez les animaux non stressés. Alors que les plus hautes dilutions 15 et 30 CH, induisent plutôt une augmentation du nombre de ces cellules (respectivement, p=0.0013 ; p= 0.0004) par rapport aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %.

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 40)= 28.065; p= 0.0001.

- Effet du traitement: F(3, 40)= 7.282; p= 0.0005.

- Interaction :F(3, 40)= 9.506; p= 0.0001.

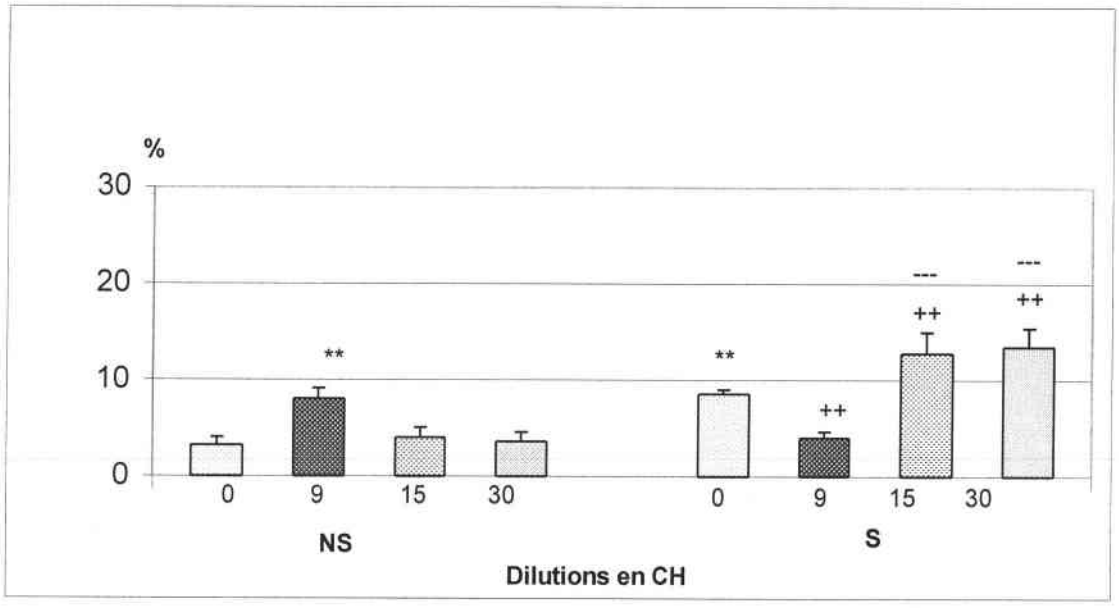


Fig. 97 Les effets des hautes dilutions de *Poumon histamine*, sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/S0; +:S0/SP.his9,15,30CH; -: NSP.his15,30/SP.his15,30CH.

2-3. *Histaminum*

2-3-1. les lymphocytes T CD4

Le traitement des animaux stressés par l'*Histaminum* 9 et 15 CH, augmente le nombre des lymphocytes T CD4 (Fig. 98) (respectivement, p=0.03 ; p=0.0004). L'effet de ces dilutions n'est pas différent statistiquement de celui de ces mêmes dilutions chez les animaux non stressés. Les dilutions 9 et 30 CH ont tendance à réduire le nombre des T CD4 chez les animaux non stressés (respectivement, p=0.004 ; p=0.0007).

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 50)= 23.057; p= 0.0001.

- Effet du traitement: F(3, 50)= 3.107; p= 0.034.

- Interaction : F(3, 50)= 6.435; p= 0.0009.

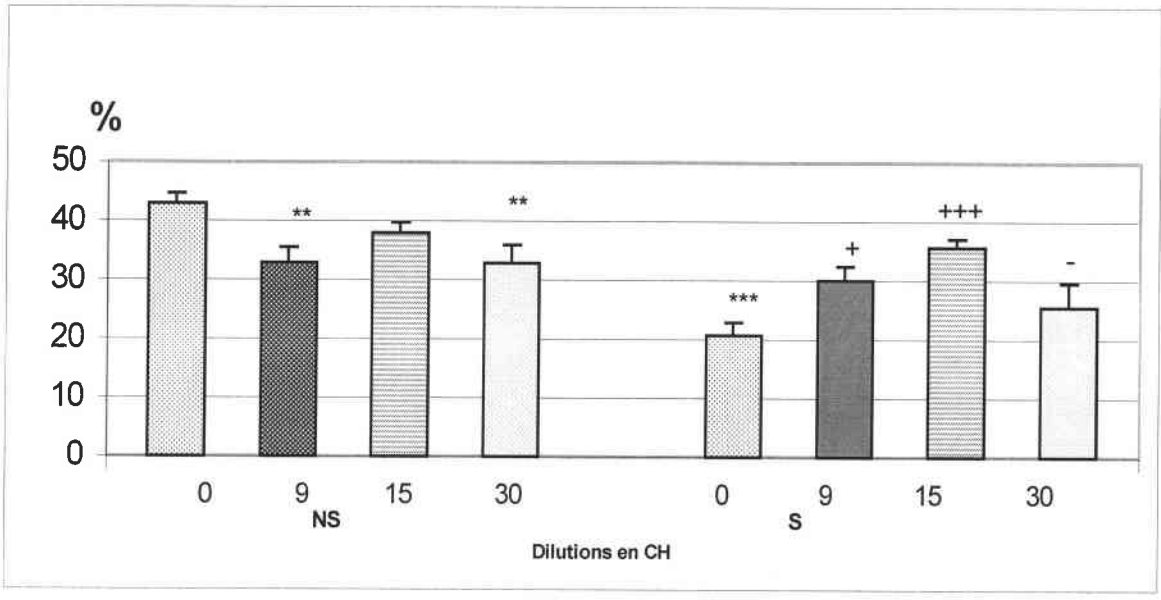


Fig. 98 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum*, sur le nombre des lymphocytes TCD4 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes. *: NS0/NSHis9 et 30, S0; +: S0/SHis9 et15; -: NShis30/Shis30.

2-3-2. Les lymphocytes T CD8 (Fig. 99)

Aucune variation statistiquement significative n'a été montrée, à la fois, chez les animaux non stressés, stressés et traités à toutes les dilutions de l'*Histaminum*

L'analyse statistique a montré que :

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress : F(1, 49)= 2.248; p= 0.140.

- Effet du traitement: F(3, 49)= 0.416; p= 0.742.

- Interaction :F(3, 49)= 0.600; p= 0.618.

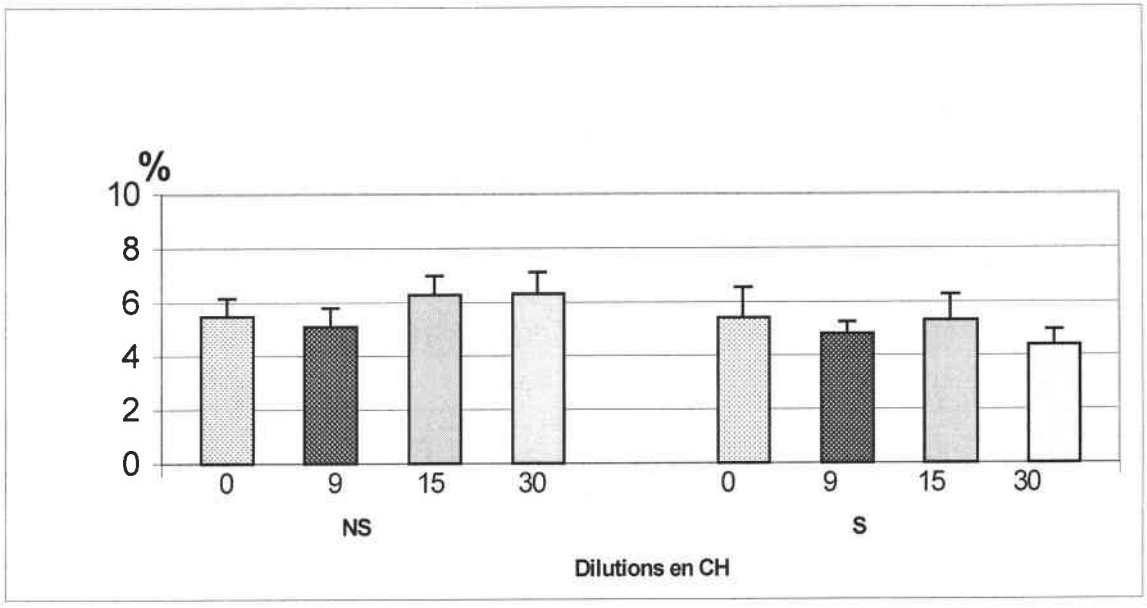


Fig. 99 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum*, sur le nombre des lymphocytes TCD8 chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes.

2-3-3. Les cellules NK

Les fortes dilutions de l'*Histaminum* (Fig. 100) (15 et 30 CH), induisent une hausse significative du nombre des cellules NK à la fois chez les animaux non stressés (respectivement, p=0.0047; p=0.010) et chez les animaux stressés (respectivement, p=0.03; p= 0.028). Alors que l'*Histaminum* 9 CH, provoque plutôt une diminution du nombre des cellules NK chez les animaux stressés (p= 0.004). On pourrait supposer que cette dilution de *l'Histaminum* a plutôt tendance à inverser les effets du stress sur le nombre des cellules NK.

L'analyse statistique a montré que:

ANOVA à deux facteurs:- Effet du stress: F(1, 42)= 0.703; p= 0.406.

- Effet du traitement: F(3, 42)= 8.827; p= 0.0001.

- Interaction : F(3, 42)= 1.141; p= 0.043.

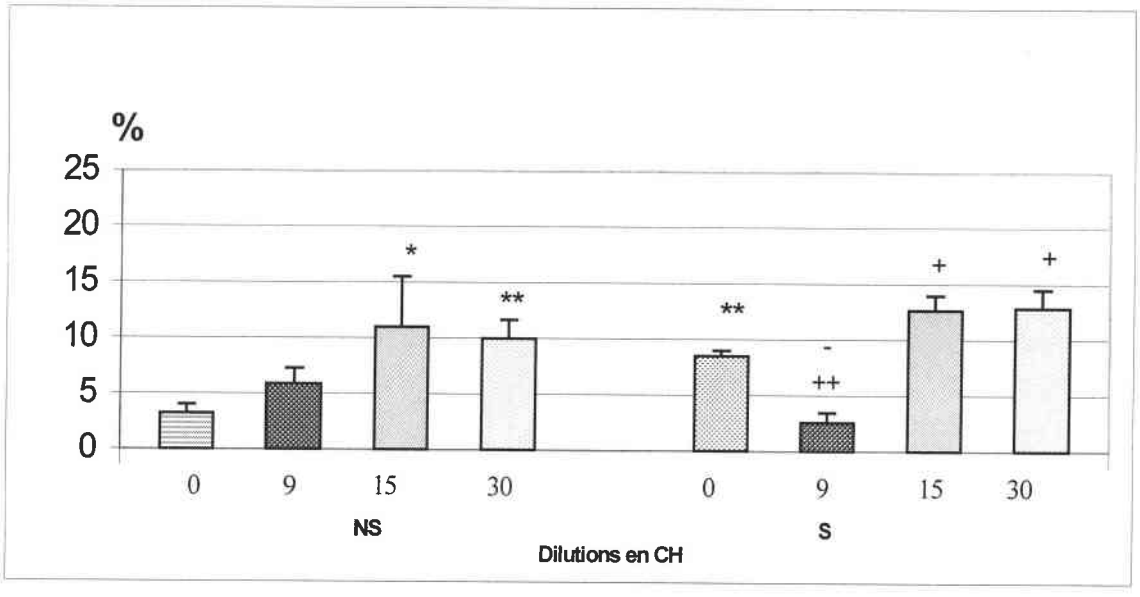


Fig. 100 Les effets des hautes dilutions de *l'Histaminum* sur le nombre des cellules NK chez la souris. N=9x8 lots. NS: non stressés; S: stressés. CH: Centésimales Hahnemaniennes. *: NS/NSHis15,30; S0; +: S0/SHis9,15 et 30CH.

D.Conclusion

Les résultats de cette partie montrent pour la première fois dans la littérature que, *Atropa belladonna* aurait plutôt un profil pharmacologique de type anxiolytique à la dilution 9 CH. *Gelselmium sempervirens* posséderait plutôt des propriétés immunoprotectrices et gastroprotectrices, particulièrement aux dilutions 5 CH et 15 CH. Ces effets sont associés probablement à leur profil neurotropique, anxiolytique-like. Cependant, *Poumon histamine* a montré un effet pharmacologique plutôt actif sur le système immunitaire à toutes les dilutions, avec un effet moins important de type neurotropique. Nous avons testé aussi un autre médicament homéopathique, l'*Histaminum* dans le but de comparer son activité à celle du *Poumon histamine* qui représente un mélange de constituants dont l'histamine fait partie. Nous avons noté ainsi que le traitement par la dilution 9 CH du *Gelsemium sempervirens*, du *Poumon histamine* et de *l'Histaminum*, s'oppose aux effets immunosuppresseurs du stress uniquement vis à vis de la réponse des cellules NK. On pourrait supposer que la dilution 9 CH de ces trois produits, possède des effets immunoprotecteurs uniquement vis à vis de la réponse des cellules NK chez les animaux stressés. Concernant la réponse des cellules TCD8, nos résultats montrent que la dilution 15 CH du *Poumon histamine* et les dilutions 15 CH et 30 CH du *Gelsemium sempervirens*, réduisent respectivement le nombre des T CD8 chez les animaux exposés au stress expérimental. Cependant aucune variation statistiquement significative n'a été notée au niveau de la régulation du nombre des cellules T CD4 chez les animaux stressés et traités à toutes les dilutions des trois produits étudiés.

DISCUSSION

I. TRAVAUX FONDAMENTAUX

I-1. Stress et réponses comportementale, immunitaire, gastrique et endocrinienne.

Dans cette première étude orientée vers les effets du stress expérimental sur les fonctions comportementale, immunitaire et gastrique chez la souris, nous avons étudié plus particulièrement les répercussions éventuelles du stress sur ces réponses à différents intervalles séparant l'immunisation du stress : 1j, 3j et 5j. Notre démarche a été de préciser tout d'abord dans une étude expérimentale l'importance de l'intervalle entre l'immunisation et l'application du stress et ses répercussions sur les réponses étudiées. Les résultats de cette étude suscitent plusieurs commentaires : Concernant la réponse immunitaire à médiation cellulaire, nous avons noté une réduction de la valeur absolue de toutes les catégories leucocytaires sauf les éosinophiles dont la valeur absolue a plutôt augmenté après l'application du stress, 1j après l'immunisation. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Millan *et al.*, (1996), qui ont montré une réduction du nombre des leucocytes chez les animaux exposés au stress expérimental (immobilisation). Dans le même sens de cette étude, nous avons montré que la diminution du nombre des leucocytes est due principalement à la réduction du nombre des lymphocytes périphériques.

Nos constatations sur les effets du stress sur la réponse humorale sont aussi en accord avec plusieurs études (Berkenbosch *et al.*, 1991; Baldwin *et al.*, 1997) qui ont noté aussi une augmentation de la réponse humorale après application du stress. En effet, l'étude de Berkenbosch *et al.*, (1991), a interprété cette hausse de la réponse humorale par une implication de l'ACTH et d'autres peptides sous le contrôle du CRF. Dans le même sens, l'étude de Baldwin *et al.*, (1997) a expliqué ce résultat par l'activation de l'axe HPA. Selon ces mêmes auteurs, cette augmentation de la réponse humorale est dépendante du sexe.

Cette première partie du travail s'est intéressée aussi aux effets du stress sur le comportement général de la souris. Contrairement à certains auteurs (Weizman *et al.*, 1999), nous avons constaté que le stress induit une diminution de l'activité exploratoire de l'animal. Nous avons noté deux stratégies différentes menées par l'animal: soit les animaux s'agitent dans tous les sens, soit ils s'immobilisent. Selon Blanchard *et al.*, (1976), cette immobilisation ou freezing est utilisée comme un indice d'expression de la peur chez le rat.

Nos résultats ont montré aussi que le stress induit des lésions de la muqueuse gastrique, ceci est en accord avec plusieurs travaux (Ludwig & Lipkin, 1969; Avunduk *et al.*, 1990 et Ishikawa *et al.*; 1999). En effet l'étude menée par Ludwig et lipkin, (1969), a montré que l'immobilisation entraîne des lésions gastriques et duodénales. Ces auteurs ont interprété ce résultat par une dégranulation des mastocytes de la muqueuse gastrique et par une diminution de la synthèse de l'ADN et de l'ARNm, ce qui engendre une diminution de la prolifération des cellules ainsi que la production des mucoprotéines de la muqueuse gastrique. Les travaux de Avunduk *et al.*, (1990) ont plutôt associé les effets du stress sur l'état de la muqueuse gastrique du rat à la diminution de la production des prostaglandines de type E_2. Ce résultat a été confirmé par l'étude de (Ishikawa *et al.*, 1999), qui a montré que les effets protecteurs de la molécule FR145715 vis à vis de des lésions de la muqueuse gastrique chez le rat soumis au stress expérimental (acidité de l'aspirine), dépendent aussi de la production endogène des prostaglandines.

Le deuxième volet de ce travail consiste à étudier les effets de deux modèles de stress (l'un physique et l'autre psychosocial) appliqué à court et à long terme sur les fonctions comportementale, immunitaire, gastrique et endocrinienne.

Cette partie de ce travail s'est intéressée principalement à valider les deux modèles de stress expérimentaux, afin de définir des paramètres objectifs et quantifiables qui nous permettent de mettre en évidence d'une manière aussi rigoureuse que possible le lien entre le stress et les différentes altérations des systèmes biologiques choisies pour l'étude.

D'une manière générale, le stress agit sur deux composantes comportementales : la composante locomotrice et la composante exploratoire. Cette action apparaît généralement être de type inhibiteur à travers les différents tests utilisés bien que quelquefois il apparaît des paradoxes entre les tests, on observe généralement une inhibition due à l'effet du stress.

Nous avons également procédé aux dosages de deux indicateurs hormonaux du stress (la corticostérone et les catécholamines). Nous avons ainsi constaté que le stress physique, augmente considérablement le taux de la corticostérone (à court terme et à long terme) et celui des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) chez les animaux stressés à court terme comparé aux animaux non stressés et à ceux exposés au stress psychosocial.

Concernant la réponse gastrique, nos résultats ont montré que l'inflammation de la muqueuse gastrique est beaucoup plus importante chez les animaux exposés au stress physique par rapport aux animaux isolés. Cette inflammation de la muqueuse gastrique pourrait être expliquée par une forte infiltration des polynucléaires neutrophiles à l'intérieur de la muqueuse gastrique des animaux exposés au stress physique.

Les résultats que nous avons obtenus concernant les effets du stress (physique et psychosocial) sur l'immunité cellulaire, ont montré que le stress physique appliqué à court et à long terme (1j et 10j), diminuent le nombre des lymphocytes auxiliaires, et augmentent le nombre des cellules NK chez les animaux stressés à court terme et à long terme (1j, 4j et 10j). Cependant, nous n'avons pas noté de variation significative du nombre des cellules T CD8 chez les animaux exposés au stress physique.

De similaires résultats ont été montré chez les animaux exposés au stress psychosocial, nous avons noté une réduction du nombre des lymphocytes TCD4 à toutes les durées du stress psychosocial (1j, 4j et 15j). Alors que le nombre des cellules NK a augmenté uniquement chez les animaux isolés pendant 1j et 4j.

Comme c'est le cas pour le stress physique, aucune variation statistiquement significative n'a été notée au niveau du nombre des cellules T CD8 chez les animaux exposés à court terme et à long terme au stress psychosocial.

Dans ce sens plusieurs auteurs, ont rapporté que le stress en général diminue le nombre des lymphocytes T CD4 (Marsland *et al.*, 1997; Pariante *et al.*, 1997), alors que le nombre des cellules NK et celui des cellules T CD8 augmente (Naliboff *et al.*, 1991; Benshop *et al.*, 1994; Bachen *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1995; Marsland *et al.*, 1997 ; Benshop *et al.*, 1997). En effet (Benshop *et al.*, 1994 et Benshop *et al.*, 1997) ont apporté des arguments qui étayent l'hypothèse selon laquelle les mécanismes adrénergiques seraient responsables de l'augmentation du nombre des cellules NK.
Dans le même sens que ces derniers travaux, on pourrait supposer que l'augmentation du nombre des cellules NK après l'application du stress expérimental, est surtout liée au détachement de ces cellules de l'endothélium vasculaire, par la fixation des catécholamines sur les récepteurs β2 adrénergiques qui se trouvent au niveau de cette catégorie cellulaire.

Plusieurs autres données plaident en faveur du rôle physiologique très important des glucocorticoïdes et des catécholamines dans la régulation de la réponse immunitaire dans des situations de stress:
- les glucocorticoïdes ont des effets directs sur le nombre des cellules T, favorisent la réponse Th2. Par conséquent, ceci potentialise l'immunité humorale (Tamada *et al.*, 1998).
- La libération de l'adrénaline et de la noradrénaline agit sur l'activation de la prolifération des cellules T et sur la production des cytokines (Sanders, 1998).
D'autres pistes prometteuses suggèrent qu'il y'aurait une implication des neuropeptides endogènes qui exercent probablement des effets immunosuppresseurs sur la réponse immunitaire, surtout que d'une part ces cellules présentent des récepteurs pour ces neuropeptides, et d'autres part, ces cellules activées sont capables de sécréter ces derniers tels que le CRH, l'ACTH et la β endorphine (Reul *et al.*, 1998). Selon l'étude de Webster *et al.*, (1997), ces neuropeptides exercent différents effets sur la réponse

immunitaire selon leur origine périphérique (réponses inflammatoires) ou centrale (effets immunosuppresseurs).

I-2. Les récepteurs opioïdes

L'intérêt porté aux opioïdes dans notre étude est en partie justifié par son implication directe et/ou indirecte dans la régulation de la réponse immunitaire. Dans cette partie du travail, les résultats obtenus ont montré que le traitement des animaux stressés à la morphine (agoniste des récepteurs opioïdes), engendre une réduction du nombre des lymphocytes TCD4 et celui des cellules TCD8 chez les animaux stressés. Ces résultats sont en accord avec ce qui a été rapporté par l'étude de Flores *et al.*, (1995). En effet, ces auteurs ont montré que l'administration de la morphine, engendre une diminution de 30 % du nombre absolu des lymphocytes T périphériques. Cette diminution n'est spécifique à aucune des sous populations des lymphocytes T. Ces auteurs ont montré que ces effets immunosuppresseurs de la morphine vis à vis de la réponse des lymphocytes périphériques sont dus d'une part, à un effet de lymphopénie surrénalien dépendant. D'autre part, à la diminution de la sensibilité des lymphocytes à une stimulation mitogénique. Les travaux de Carr & France, (1993) ont montré que le traitement à la morphine, provoque une réduction de 10 à 12 % des cellules T CD4 périphériques et plutôt une augmentation de 20 à 22 % des cellules T CD8 chez le singe. Contrairement aux effets constatés dans cette même étude, au niveau du nombre des cellules TCD4 et celui des TCD8, la morphine provoque plutôt une augmentation du nombre des cellules NK périphériques chez les animaux stressés. D'autres travaux (Cunnick *et al.*, 1989, Bayer *et al.*, 1990, Carr *et al.*,1993) se sont intéressés plutôt à étudier les effets des opiacés sur l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, Cunnick *et al.*, (1989) ont mis en évidence l'implication des récepteurs opioïdes dans l'altération de l'activité cytotoxique des cellules NK. Bayer *et al.*, (1990) ont montré que le traitement aigu et chronique à la morphine, induit une diminution de l'activité cytotoxique des cellules NK. De façon similaire les travaux de Carr *et al.*, (1993) ont rapporté que la morphine, induit aussi une réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK. Selon cette dernière étude, ceci est due à l'implication des récepteurs μ_2 au niveau du cerveau (mécanismes centraux neuroendocriniens) et à celle des récepteurs α

adrénergiques au niveau de la régulation périphérique. L'étude de Jacobs *et al.*, (1999) a montré chez l'homme que le fentanyl (agoniste des récepteurs μ opioïdes), provoque une augmentation importante du nombre des cellules NK périphériques (258 %). Selon ces auteurs, les opioïdes agissent via le système nerveux central, non pas directement sur les cellules NK. En accord avec les résultats obtenus dans notre équipe, ces auteurs ont montré aussi chez deux sujets traités à la naloxone, une importante augmentation du nombre des cellules NK. Les résultats de notre travail indiquent aussi que le prétraitement à la naloxone 2mg/kg avant la morphine 5mg/kg, inverse les effets négatifs induits après l'application du stress vis à vis du nombre des lymphocytes T CD4 et celui des cellules NK chez les animaux stressés. Plusieurs travaux ont montré que le prétraitement à la naloxone, controverse les effets du stress. En effet, Marotti *et al.*, (1996) ont montré que l'administration de la naloxone avant l'application du stress (contention), inverse les effets immunosuppresseurs induits par le stress tels que l'augmentation de la phagocytose et la diminution de la prolifération lymphocytaire chez la souris. Selon cette même étude, l'activation de l'axe HPA et la sécrétion des peptides opioïdes sont probablement responsables de l'altération de la réponse immunitaire après l'application du stress.

Dans le même sens, nos résultats renforcent l'hypothèse selon laquelle il y'aurait une implication des récepteurs opioïdes dans l'altération de la réponse immunitaire à médiation cellulaire chez la souris. Le mécanisme d'action des peptides opioïdes dans l'altération immunitaire n'est pas encore bien connu. Cependant plusieurs hypothèses pourraient être émises:

- Le nombre des lymphocytes T CD4 et celui des T CD8 périphériques diminuent après l'administration de la morphine chez les animaux stressés, ceci est du probablement à une réduction de la prolifération de ces catégories lymphocytaires: les facteurs primordiaux qui contribuent à la prolifération lymphocytaire sont l'IL-1 et l'IL-2. On pourrait supposer que la diminution de la production de l'IL-1 et celle de l'IL-2 sous l'effet de la morphine (Lysle *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1998), entraîne la diminution de la prolifération lymphocytaire, ce qui réduit probablement le nombre de ces lymphocytes périphériques.

- Les peptides opioïdes endogènes activent l'axe HPA, ce qui entraîne la libération des glucocorticoïdes qui exerceraient par la suite des effets immunosuppresseurs (Roy & Loh, 1996, Marotti *et al.*, 1996).

- L'activation du SNA est en partie responsable des effets immunosuppresseurs de la morphine (Flores *et al.*, 1996).

- Les peptides opioïdes endogènes agissent directement via les récepteurs opioïdes au niveau des lymphocytes (Radulescu *et al.*, 1991).

I-3. Les récepteurs benzodiazépiniques

Il est connu que les récepteurs benzodiazépiniques sont impliqués dans la réponse au stress, c'est pour cela qu'on a pensé utile d'étudier, l'implication éventuelle de ces récepteurs dans les effets immunosuppresseurs induits après l'application du stress expérimental.

Il faut souligner que la rareté et le manque des travaux publiés dans ce domaine a rendu cette partie du travail très difficile à discuter. A part les travaux de (Galdiero *et al.*, 1995; Zavala, 1997 et Morgulis *et al.*, 1999), peu d'auteurs se sont intéressés au retentissement de l'implication des récepteurs benzodiazépiniques dans la réponse immunitaire. Cependant leur intérêt n'a pas ciblé, comme dans notre étude, particulièrement l'immunité cellulaire (TCD4, TCD8 et NK) mais la réponse immunitaire dans sa globalité. En effet, l'étude de Morgulis *et al.*, (1999) s'est plutôt intéressée à déterminer l'implication des récepteurs benzodiazépiniques dans l'activité des macrophages chez le poussin. Ces mêmes auteurs ont rapporté que les effets du stress sur l'immunité non spécifique font impliquer en partie les récepteurs benzodiazépiniques. En outre, les travaux réalisés chez la souris par Galdiero *et al.*, 1995, ont montré qu'un traitement à long terme aux benzodiazépines (agonistes benzodiazépiniques), 2 à 3 mois, induit une réduction des réponses immunitaires spécifiques et non spécifiques. Selon cette même étude, le traitement aux benzodiazépines atténue la chimiotaxie, la phagocytose de *Saccharomyces cerevisiae*, l'immunité générale et la durée de la survie aux infections.

Par ailleurs les résultats rapportés par Zavala, (1997), ont montré que les benzodiazépines anxiogènes suppriment la réponse immunitaire alors que les anxiolytiques protégent plutôt cette réponse de l'immunosuppression induite par le stress. Dans le même sens que cette étude, nos résultats montrent que le traitement au clorazépate dipotassique (particulièrement la dose 0.1 mg/kg) des animaux exposés préalablement au stress expérimental, provoque une augmentation du nombre des lymphocytes T CD4 comparé aux lots témoins (animaux stressés et traités au NaCl 0.9%). Par conséquent nos résultats montrent que le clorazépate dipotassique administré aux animaux stressés, inverse complètement les effets immunodépresseurs du stress vis à vis de la régulation du nombre des lymphocytes TCD4. Nous avons noté de similaires constatations au niveau de la régulation de la réponse des cellules NK chez les animaux stressés et traités à la dose 0.1mg/kg. L'administration du flumazénil seul, a plutôt tendance à agir uniquement sur la réponse des cellules NK chez les animaux stressés et non stressés. En accord avec les travaux d'Izumi *et al.*, (1999), on pourrait expliquer les effets du flumazénil sur la réponse des cellules NK des animaux stressés, par l'antagonisme qu'il exerce sur les agonistes inverses endogènes libérés en situation de stress et qui sont probablement responsables en partie des perturbations engendrées par l'application du stress. Nous avons noté aussi que la combinaison du prétraitement au flumazénil et du traitement au clorazépate dipotassique chez les animaux stressés, entraîne un antagonisme vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4 et celui des cellules NK. Par conséquent, on pourrait conclure que l'action protectrice du clorazépate dipotassique contre les effets immunodépresseurs du stress passe bien via les récepteurs benzodiazépiniques vis à vis de la régulation du nombre des cellules TCD4 et en partie vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK. On pourrait expliquer en partie cette protection de la réponse des cellules TCD4 et des cellules NK chez les animaux stressés par l'effet psychotrope du clorazépate dipotassique sur la perception du stress par l'animal.

Dans le même sens que les travaux (Drugan *et al.*, 1988, Ferrarese *et al.*, 1991), ces résultats laisseraient supposer que le stress expérimental utilisé dans ce travail, induit une augmentation de la densité des sites benzodiazépiniques et par conséquent une

forte occupation de ces sites par les benzodiazépines, ce qui a probablement induit cette protection vis à vis de la régulation du nombre des TCD4 et celui des cellules NK.

On pourrait aussi attribuer à ces effets, des fois paradoxaux, une cause liée aux doses utilisées. Ainsi l'étude menée par Ikezaki *et al.*, (1990), a rapporté que les faibles concentrations des benzodiazépines, entraînent une induction de la prolifération cellulaire. D'autres travaux (Beinlich *et al.*, 1999 et Carmel *et al.*, 1999) ont montré aussi un effet biphasique des benzodiazépines sur la prolifération cellulaire. Selon ces mêmes auteurs, les faibles concentrations de l'ordre de **nmole** stimulent la synthèse de l'ADN, alors que les fortes concentrations induisent plutôt des effets antiprolifératifs.

D'autres travaux de Freeman & Thurmond, (1986) ont montré que les faibles doses des benzodiazépines, empêchent l'augmentation de la libération des glucocorticoïdes induite par le stress, alors que les fortes doses induisent plutôt une augmentation de la sécrétion des glucocorticoïdes, probablement responsables de l'immunodépression.

En plus de la voie indirecte des effets des benzodiazépines sur la réponse immunitaire, plusieurs études ont montré l'existence des récepteurs benzodiazépiniques périphériques au niveau des cellules immunitaires (Canat *et al.*, 1992, Covelli *et al.*, 1998). On pourrait ainsi supposer que les benzodiazépines agissent aussi en partie directement sur les récepteurs benzodiazépiniques existants au niveau des cellules immunitaires.

Dans le même sens que les travaux de Zavala, (1997), on pourrait supposer que sous l'effet du stress (sans le traitement avec les benzodiazépines), le DBI (agoniste inverse endogène des récepteurs BZD) agit en modulant négativement la réponse immunitaire. Selon cette même étude, le DBI (agit au niveau périphérique et central), exerce une modulation allostérique négative au niveau des récepteurs benzodiazépiniques centraux $GABA_A$. Comme c'est le cas pour le stress, cette modulation négative des récepteurs $GABA_A$, stimule la libération du CRH, qui augmente à son tour l'ACTH et la sécrétion périphérique des glucocorticoïdes. Selon cet auteur, le DBI interagit aussi avec les récepteurs BZD périphériques au niveau des cellules gliales et induit la synthèse des neurostéroïdes au niveau cérébral et celle des glucocorticoïdes au niveau des surrénales après la stimulation des récepteurs benzodiazépiniques périphériques, ce qui

sous régule la réponse immunitaire de type Th1 (la réponse cellulaire) et potentialise plutôt la réponse de type Th2 (la réponse humorale).

Dans cette même partie du travail, nous avons montré pour la première fois dans la littérature, une interaction entre les systèmes opioïdergiques, benzodiazépiniques et le stress vis à vis de la régulation de l'immunité à médiation cellulaire chez l'animal. Nos résultats ont montré que ces deux systèmes interagissent dans les effets immunodépresseurs du stress uniquement vis à vis de la régulation du nombre des cellules NK.

II. Applications

Nous avons entrepris une étude expérimentale (en utilisant le modèle de stress physique) dans laquelle nous avons étudié les effets des dilutions de *Atropa belladonna* L., du *Gelsemium sempervirens* et du *Poumon histamine* 5 CH, 9 CH et 15 CH, sur les réponses étudiées auparavant.

Les résultats de ce travail (Bousta *et al.*, 2001) ont montré que *Atropa belladonna* aurait plutôt un profil pharmacologique de type anxiolytique à la dilution 9 CH. *Gelselmium sempervirens* posséderait plutôt des propriétés immunoprotectrices et gastroprotectrices, particulièrement aux dilutions 5 CH et 15 CH. Ces effets sont associés probablement à leur profil neurotropique, anxiolytique-like. Cependant, *Poumon histamine* a montré un effet pharmacologique plutôt actif sur le système immunitaire à toutes les dilutions. Ces effets de *Poumon histamine* sont probablement associés à sa principale activité pharmacologique sur le système immunitaire, avec un effet secondaire de type neurotropique.

Pour la suite des travaux, on a pensé utile d'étudier l'activité d'une $4^{ème}$ dilution 30 CH du *Poumon histamine* et du *Gelsemium sempervirens,* puisque l'activité de ces produits a été montrée surtout à la dilution 15 CH. On a focalisé l'étude sur la réponse immunitaire cellulaire (les lymphocytes T CD4, T CD8 et NK périphériques). Nous avons testé aussi un autre produit, l'*Histaminum* dans le but de comparer son activité à celle du *Poumon histamine* qui représente un mélange de constituants très complexe dont l'histamine fait

partie. Nous avons noté ainsi que le traitement par la dilution 9 CH du *Gelsemium sempervirens*, du *Poumon histamine* et de *l'Histaminum*, s'oppose aux effets immunosuppresseurs du stress vis à vis de la réponse des cellules NK. On pourrait supposer que la dilution 9 CH de ces trois produits, possède des effets immunoprotecteurs uniquement vis à vis de la réponse des cellules NK chez les animaux stressés. Concernant la réponse des cellules TCD8, nos résultats montrent que la dilution 15 CH du *Poumon histamine* et les dilutions 15 CH et 30 CH du *Gelsemium sempervirens*, réduisent respectivement le nombre des T CD8 chez les animaux exposés au stress expérimental. Cependant aucune variation statistiquement significative n'a été notée au niveau de la régulation du nombre des cellules T CD4 chez les animaux stressés et traités à toutes les dilutions des trois produits étudiés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de notre travail était de faire une étude aussi complète que possible des effets du stress expérimental sur les réponses comportementale, gastrique, endocrinienne et immunitaire chez la souris. Une des originalités de cette étude réside d'une part, dans l'association de l'aspect comportemental aux investigations immunologiques, endocriniennes et histologiques après l'exposition au stress expérimental. D'autre part, dans la validation des modèles de stress fiable, reproductible et répétable.

Ainsi, notre première étude ayant porté sur la validation des modèles de stress expérimental utilisé, a permis de montrer l'importance de l'intervalle entre l'immunisation et l'application du stress. Le stress appliqué 24 h après l'immunisation provoque d'une part, une diminution de l'activité exploratoire et locomotrice. D'autre part, nous avons constaté que le stress, engendre une augmentation du nombre des lésions de la muqueuse gastrique ainsi que le taux des anticorps totaux. Cette étude s'est intéressée aussi à l'influence du stress sur l'immunité cellulaire. Elle a ainsi montré que le stress est à l'origine des perturbations de la réponse des cellules immunitaires périphériques, notamment une diminution du nombre des cellules T CD4 et une augmentation du nombre des NK.

Afin de mettre en évidence l'existence réelle d'une situation de stress, nous avons également procédé aux dosages de deux indicateurs hormonaux du stress, à savoir la corticostérone et les catécholamines (la noradrénaline et l'adrénaline). Ainsi comme nos résultats l'ont montré, le stress engendre une augmentation du taux de la corticostérone et celui des catécholamines plasmatiques, en particulier la noradrénaline.

A l'issue de cette étude, plusieurs questions sont restées posées concernant d'une part, les voies impliquées directement et/ou indirectement dans les répercussions du stress sur le système immunitaire, d'autre part l'implication des systèmes de neurotransmission opioïdergique et benzodiazépinique dans ces effets immunodépresseurs engendrés par le stress.

En effet, nous avons constaté que les opiacés, potentialisent les effets immunosuppresseurs du stress sur l'immunité à médiation cellulaire. Nous avons conclu, l'implication des récepteurs opioïdes dans les effets immunodépresseurs induits par le stress. La poursuite de cette partie pourrait concerner la ou les voies d'action des opiacés sur la réponse immunitaire à médiation cellulaire. Nous avons émis des hypothèses qu'il faudrait étayer en orientant des recherches vers une administration centrale des opiacés d'une part, et une étude *in vitro*, en évaluant par exemple la prolifération cellulaire sous l'effet des opiacés. D'autre part, en déterminant l'implication des cytokines (IL-1 et IL-2) dans la prolifération cellulaire après l'administration des opiacés.

Concernant l'implication des benzodiazépines, nous avons noté un effet immunoprotecteur des faibles doses du Tranxène (benzodiazépine à profil anxiolytique), vis à vis de l'immunité cellulaire des animaux stressés. Nous avons montré aussi que le flumazénil (antagoniste des récepteurs benzodiazépiniques), administré aux animaux stressés a tendance à inverser les effets du stress vis à vis de la régulation du nombre des cellules T CD4 et celui des cellules NK, particulièrement après l'administration des doses intermédiaires (5mg/kg) comparé aux animaux stressés et traités au NaCl 0.9 %.

Dans cette partie de ce travail, il serait intéressant aussi de déterminer le rôle et l'implication des neurostéroïdes (centraux) et des glucocorticoïdes (périphériques) dans les effets immunodépresseurs engendrés par le stress expérimental, en étudiant dans un premier temps, les effets d'un prétraitement aux anticorps anti-DBI et/ou anti-CRH chez les animaux stressés. Dans un deuxième temps, on évalue après un prétraitement aux benzodiazépines, le taux des neurostéroïdes et celui des glucocorticoïdes ainsi que la prolifération cellulaire chez les animaux stressés.

Enfin, les perspectives de ce travail peuvent concerner aussi le rôle et l'implication des cytokines, dans l'impact du stress sur le fonctionnement du système immunitaire. Non seulement, celles-ci coordonnent l'action des différents types de cellules immunitaires, mais elles permettent également une régulation efficace de la fonction immune par le système nerveux central. Le rôle joué par les cytokines cérébrales dans l'activation de l'axe corticotrope, ainsi que dans les modifications comportementales et psychiques, ouvre de nouvelles voies de recherche. Des altérations de l'expression de ces cytokines pourraient contribuer dans certaines pathologies mentales telles que la dépression.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anholt, R.R.H.; DeSouza, E.B.; Oster-Granite, M.L.; Snyder, S.H. Peripheral-type benzodiazepine receptors: autoradiographic localization in whole-body sections of neonatal rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 223:517-526; 1985.

Avunduk, C.; Eastwood, G.L.; Polakowski, N.; Quimby, F. Effects of stress on gastric mucosal prostaglandin generation in intact, adrenalectomised, and sham-operated rats. J. Clin. Gastroenterol. 12:48-51; 1990.

Bachen, E.A.; Manuck, S.B.; Marsland, A.L.; Cohen, S.; Malkoff, S.B.; Muldoon, M.F.; Rabin, B.S. Lymphocyte subset and cellular immune responses to a brief experimental stressor. Psychosomatic Med. 54:673-679; 1992.

Bachen, E.A.; Manuck, S.B.; Marsland, A.L.; Cohen, S.; Malkoff, S.B.; Muldoon, M.F.; Raible, R.; Herbert, T.B.; Rabin, B.S. Adrenergic blockade ameliorates cellular immune responses to mental stress in humans. Psychosomatic Med. 57:366-372; 1995.

Baldwin, D.R.; Wilcox, Z.C.; Baylosis, R.C. Impact of differential housing on humoral immunity following exposure to an acute stressor in rats. Physiol and Behav. 57:649-653; 1995.

Baldwin, D.R.; Wilcox, Z.C.; Zheng, G. The effects of voluntary exercise and immobilization on humoral immunity and endocrine responses in rats. Physiol and Behav. 61:447-453; 1997.

Banerjee, B.D.; Koner, B.C.; Ray, A. Influence of stress on DDT-induced humoral immune responsiveness in mice. Envirnmental Research. 74:43-47; 1997.

Batuman, O.A.; Sojewskid, N.; Ottenweller, J.E.; Pitman, D.L.; Natelson, B.H. Effects of repeated stress on T cell numbers and function in rats. Brain. Behav and Immun. 4:105-117; 1990.

Bayer, B.M.; Daussin, S.; Hernandez, M.; Irwin, L. Morphine inhibition of lymphocyte activity is mediated by an opioid dependent mechanism. Neuropharmacol. 29:369-373; 1990.

Benavides, J., Dubois, A., Dennis, T.; Hamel, E.; Scatton, B. Omega 3 (peripheral type benzodiazepine binding) site distribution in the rat immune system: an autoradiographic study with the photoaffinity ligand ^{3}H-PK 14105. J. Pharmacol. Exp. Ther. 249:333-339; 1989.

Benshop, R.J.; Nieuwenhuis, E.E.S.; Tromp, E.A.M.; Godaert, G.L.R; Ballieux, R.E.; Van Doornen, L.J.P. Effects of β-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. Circulation. 89:762-769; 1994.

Benshop, R.J.; Oostveen, F.G.; Heijnen, G.J., Ballieux, R.E.. β2 adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium. Eur. J. Immunol. 23:3242-3247; 1993.

Benshop, R.J.; Scheldowski, M., Wienecke, H.; Jacobs, R.; Schmidt, R.E. Adrenergic control of natural killer cell circulation and adhesion. Brain Behav Immun. 11:321-332; 1997.

Berkenbosch, F.; Wolvers, D.A.W.; Derijk, R.J. Neuroendocrine and immunological Mechanisms in stress-induced immunomodulation. J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 40: 639-647; 1991.

Bessler, H.; Caspi, B.; Gavish, M.; Rehavi, M.; Hart, J.; Weizman, R. Peripheral type benzodiazepine receptor ligands modulate human natural killer cell activity. Intern. J. Immunopharmacol. 19 :239-249 ; 1997.

Bessler, H.; Weizman, R.; Gavish, M.; Notti, I.;& Djaldetti, M. Immunomodulatory effect of peripheral benzodiazepines receptor ligands on human mononuclear cells. J. Neuroimmunol. 38:19-25; 1992.

Blanchard, R.J.; Fukunaga, K.K., Blanchard, D.C. Environmental control of defensive reactions to footshock. Bulletin of the Psychonomic Society. 8:129-130; 1976.

Bond, P. A.; Cundall, R.L.; Rolfe, B. ^{3}H-diazepam binding to human granulocytes. Life Sci. 37:11-16; 1985.

Bousta, D.; Soulimani, R.; Jarmouni, I.; Belon, P.; Falla, J.; Froment, N.; Younos, C. Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L., *and Poumon histamine* in stressed mice. J of Ethnopharmacol. 74:205-215; 2001.

Braestrup, C.; Squires, R.F. Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity ^{3}H-diazepam binding. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 3805-3809; 1977.

Burgin, R.; Weizman, R.; Gavish, M. Repeated swim stress and peripheral–type benzodiazepine receptors. Neuropsychobiol. 33:28-31; 1996.

Canat, X.; Carayon, P.; Bouaboula, M.; Cahard, D.; Shire, D.; Roque, C.; Le Fur, G.; Casellas, P. Distribution profileand properties of peripheral-type benzodiazepine receptors on human hemopoetic cells. Life Sci. 52:107-118; 1992.

Carmel, I.; Fares, F.A.; Leschiner, S.; Scherübi, H.; Weisinger, G.; Gavish, M. Peripheral type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line. Biochemical. Pharmacology. 58:273-278; 1999.

Carr, D.J.; France, C.P. Immune alterations in chronic morphine treated rhesus monkeys. J. Pharmacol. Exp. Ther. 267:9-15; 1993.

Carr, D.J.J.; Gebhardt, B.M.; Paulm, D. Alpha adrenergic and mu-2 receptors are involved in morphine–induced suppression of splenocyte natural killer activity. J. Pharmacol. Exp Ther. 264:1179-1186; 1993.

Chamberlain, CE. Acute hemorrhagic gastritis. Gastroenterol Clin North Am. 22:843-873; 1993.

Chang, S.L.; Wu, G.D.; Patel, N.A.; Vidal, E.L.; Fiala, M. The effects of interaction between morphine and interleukin-1 on the immune response. Drugs of Abuse, Immunomodulation, and Aids, edited by friedman et al. Plenum.Press. New York, 67-72; 1998.

Chao, C.C.; Hu, S.; Molitor, T.W.; Zhou, Y.; Murtaugh, M.P.; Tsang, M.; Peterson, P.K. Morphine potentiates transforming growth factor-β release from human peripheral blood mononuclear cell cultures. J Pharmacol Exp Ther. 262:19-24; 1992.

Cheng, J.; Roques, B.P.; Godl, G.A.; Huang, E.; Pasternak, G.W. Opiate receptor binding in the mouse and the rat. Eur. J. Pharmacol. 226:15-20; 1992.

Chuang, T.K.; Killam, K.F.; Chuang, L.F.; Kung, H-F.; Sheng, W.S.; Chao, C.C.; Yu, L.; Chuang, R.Y. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. Biochemical and Biophysical Research Communications. 216:922-930; 1995.

Cohen, A. Plasma corticosterone concentrations in the fetal rat. Hor. Met. Res. 5:66-69; 1973.

Cooper, M.J.; Hutchins, G.M.; Israel, M.A. Histogenesis of the human adrenal medulla. An evaluation of the ontogeny of chromaffin and non chromaffin lineages. Am. J. Pathol. 137:605-615; 1990.

Costall, B.; Jones, B.J.; Kelly, M.E.; Naylor, R.J.; Tomkins, D.M. Exploration of mice in a black and white test box : validation as a model of anxiety. Pharmacol. Biochem and Behav. 32:777-785; 1989.

Coupland, R.E. The natural history of the chromaffin cell: twenty five years on the beginning. Arch. Histol. Cytol. 52:331-341; 1989.

Covelli, V.; Maffione, A.B.; Nacci, C.; Tato, E.; Jirillo, E. Stress neuropsychiatric disorders and immunological effects exerted by benzodiazepines. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 20:199-209; 1998.

Crawley, J.N.; Goodwin, U.K. Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiaepines. Pharmacol. Biochem. Behav. 13:167-170; 1980.

Cunnick, J.E.; Lysle, D.T.; Armfield, A.; Rabin, B.S. Shock induced immunosuppression naltrexone sensitive and insensitive parameters. Molecular. Biology of Stress. 24:205-214; 1989.

Daly, J.R.; Evans, J.L. Daily rhythms of steroids and associated pituitary hormones in man and their relationship to sleep. In: advances in Steroid Biochemistry and Pharmacology, (eds) Briggs, M.H.; Christie, G.A.; Academic Press, Ed., London, New york, 61-110; 1974.

Denis, A. Les modèles de l'anxiété anxiolytique, perspectives thérapeutiques thérapeutiques. Thèse d'Exercice : Pharmacie. Rouen; 1997.

DeSouza, E.B.; Anholt, R.R.; Murphy, K.M.; Snyder, S.H.; Kuhar, M.J. Peripheral-type benzodiazepines receptors in endocrine organs : autoradiographic localization in rat pituitary adrenal, and testis. Endocrinol. 116:567-573; 1985.

Dobbs, C.M.; Vasques, M.; Glaser, R.; Sheridan, J.F. Mecanism of stress induced modulation of viral pathogenesis and immunity. J. of Neuroimmunol. 48:151-160; 1993.

Drago, F.; Di Leo, F.; Giardina, L. Prenatal stress induces body weight deficit and behavioural alterations in rats: the effect of diazepam. Europ Neuropsychopharmacol. 9:239-245; 1999.

Drugan, R.C.; Basile, A.S.; Crawley, J.N.; Paul, S.M.; Skolnick, P. Characterization of stress-induced alterations in ^{3}HR05-4864 binding to peripheral benzodiazepines receptors in rat heart and kidney. Pharmacol. Biochem. Behav. 30:1015-1020; 1988.

Eddleston, J.M.; Pearson, R.C.; Holland, J.; Tooth, J.A.; Vohra, A.; Dora, B.H. Prospective endoscopic study of stress erosions and ulcers in crucially ill adult patients treated with either sucralfate or placebo. Crit Care Med. 22:1949-1954; 1994.

Ehrenström, F. Determination of catechols in small volumes of plasma using ion-pair reversed phase liquide chromatography/electrochemistry. Life Sci. 43:615-627; 1988.

Elenkov, I.J.; Chrousos,G.P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease.Tem.10:359-368; 1999.

Elenkov, I.J.; Papanicolaou, D.A.; Wilder, R.L.; Chrousos, G.P. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. Proc. Assoc. Amer. Physic. 108:374-381; 1996.

Esterling, B.; Rabin, B.S. Stress induced alteration of T lymphocyte subset and humoral immunity in mice. Behav. Neurosci. 101:115-119; 1987.

Famularo, G.; De Simone, C.; Marcellilni, S. Apoptosis, mechanisms and relation to Aids. Med Hypotheses. 48:423-429; 1997.

Fecho, K.; Dykstra, L.A.; Lysle, D.T. Evidence for Beta adrenergic receptor involvement in the immunomodulatory effects of morphine. J of pharmacol and Exper Ther. 265:1079-1087; 1993.

Ferrarese, C.; Mennini, T.; Pecora, N.; Pierpaoli, C.; Frigo, M.; Marzorati, C.; Gobbi, M.; Bizzi, A.; Codegoni, A.; Garattini, S. Diazepam binding inhibitor (DBI) increases after acute stress in rat. Neuropharmacol. 30:1445-1452; 1991.

Flores, L.R.; Dretchen, K.L.; Bayer, B.M. Potential role of autonomic nervous system in the immunosuppressive effects of acute morphine administration. Eur J of Pharmacol. 318:437-446; 1996.

Flores, L.R.; Whal, S.M.; Byer, B.M. Mechanisms of morphine–induced immunosuppression : effect of morphine on lymphocyte trafficking. J. Pharmacol. Exp. Ther. 272:1246-1251; 1995.

Freire-Garabal, M.; Balboa, J.L.; Fernandez-Rial, J.C.; Nunez, M.J.; Belmonte, A. Effects of alprazolam on influenza virus infection in stressed mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 46: 311-316; 1993.

Freire-Garabal, M.; Couceiro, J.; Balboa, J.L.; Nunez, M.L.; Fernandez-Rial, J.C.; Cimadevila, B.; Guttierez, C.; Loza, M.I.; Belmonte, A. Effects of diazepam on the resistance, on the development of immunity and the passive transfer of immunity to *listeria monocytogenese*; in mice submitted to surgical stress. Acta Ther. 17:355-362; 1991.

Freeman, G.B.; Thurmand, J.B. Monoamines and effects of chlordiazepoxide on the corticosterone response to stress. Physiol. Behav. 37:933-938; 1986.

Fuchs, B.A.; Pruett, S.B. Morphine induces apoptosis in murine thymocytes *in vivo* but not *in Vitro*: involvement of both opiate and glucocorticoid receptors. J Pharmacol. Exp.Ther. 266:417-423; 1993.

Galdiero, F.; Bentivoglio, C.; Nuzzo, I.; Ianniello, R.; Capasso, C.; Mattera, S.; Nazzaro, C.; Galdiero, M.; Romano Carratelli, C. Effects of benzodiazepines on immunodeficiency and resistance in mice. Life Sci. 57:2413-2423; 1995.

Genetet, N. Immunologie. 3ème édition, Paris: Editions Médicales Internationales; 1997.

Guermonperez, M.; Pinkas, M.; Torck, M. Matière médicale homéopathique. 2ème édition, Editions Boiron; 1997.

Hedman, L.A.; Rockekt, L.L.; Lunden, P.M. The effect of steroids on the cieculating lymphocyte population-VI. Studies of the thoracic duct and T, B lymphocyte population after neonatal thymectomy and prednisolone treatement an immunofluorescence study in the rat. Int. J.Immunopharmacol. 6:357-363; 1984.

Hernandez, D.E.; Stanley, D.A.; Melvin, J.A.; Prange, A.J. Role of brain neurotransmitters on neurotensin-induced gastric cytoprotection. Pharmacol. Biochem. Behav. 22:509-513; 1985.

Hoffman-Goetz, L.; Pedersen, B.K. Exercise and the immune system: a model of the stress response?. Immunol. Today. 15:382-387; 1994.

Ikezaki, K.; Black, K.L. Stimulation of cell growth and DNA synthesis by peripheral benzodiazepine. Cancer Lett. 49: 115-120; 1990.

Ishikawa, H.; Ito, H.; Higaki, M.; Higaki, M.; Matsumoto, Y.; Kamimura, T.; Katsura, Y.; Tomishi, T.; Inoue, Y.; Takasugi, H.; Tomoi, M.; Krakowka, S.; Yoshida, K. FR145715, a novel histamine H2 receptor antagonist, with specific anti-*Heliobacter pylori* activities. Eur. J. of Pharmacol. 378:299-310; 1999.

Izumi, T.; Inoue, T.; Tsuchiya, K.; Hashimoto, S.; Ohmori, T.; Koyama, T. Effects of the benzodiazepine antagonist flumazenil on conditioned fear stress in rats. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiat. 23:1247-1258; 1999.

Jacobs, R.; Kartst, M.; Scheinichen, D.; Bevilacqua, C.; Schneider, U.; Heine, J.; schedlowski, M.; Schmidt, R.E. Effect of fentanyl on cellular immune functions in man. Inter J. Immunopharmacol . 21:445-454; 1999.

Jacobson, L.; Sapolsky, R. The role of hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary adrenocortical axis. Endocrinol. Rev. 12:118-134; 1991.

Jessop, J.J.; Gale, K.; Bayer, B.M. Enhancement of rat lymphocyte proliferation after prolonged exposure to stress. J. Neuroimmunol. 16:261-271; 1987.

Jiang, Q.; Takemori, A.E.; Sultana, M.; Portoghese, P.S.; Bowen, W.D.; Mosberg, H.I.; Porreca, F. Differential antagonism of delta opioid antinociception by (D-Ala^2, Leu^5, Cys^6) enkephalin and naltrindole 5'-isothiocyanate : evidence for delta receptor subtypes. J. Pharmacol. Exp. Ther. 257:1069-1075; 1991.

Jonsdottir, I.H.; Hellstrand, K.; Thoren, P.; Hoffmann, P. Enhancement of natural immunity seen after voluntary exercise in rats. Role of central opioid receptors .Life Sci. 66:1231-1239; 2000.

Kafuman, J.J.; Semo, N.M.; Kaski, W.S. Microelectrometric titration measurement of the pK'a and partition and drug distribution coefficients of narcotics antagonists and their pH and temperature dependance. L. Med. Chem. 8: 647-655; 1975.

Kavelaars, A.; Ballieux, R.E.; Heijnen, C.J. Differential effect of β-endorphin on AMP_c levels in human peripheral blood mononuclear cells. Brain. Behav. Immun. 4:171-179; 1990.

Kilfoil, T.; Michel, A.; Montgomery, D.; Whiting, R.L. Effect of anxiolytic and anxiogenic drugs on exploratory activity in a simple model of anxiety in mice. Neuropharmacol. 28:901-905; 1989.

Kobayashi, S.; Coupland, R.E. Morphological aspects of chromaffin tissue: the differential fixation of adrenaline and noradrenaline. J. Anat. 183:223-235; 1993.

Kusnecov, A.V.; Grota, L.J.; Schmidt, M.; Bonneau, R.H.; Scheridan, J.F.; Glaser, J.K.; Moynihan, J.A. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. J. Neuroimmunol. 38:129-138; 1992.

Laudenslager, M.L.; Fleshner, M.; Hofstadte, P.; Held, P.E.; Simon, L.; Maier, S.F. Suppression of specific antibody production by inescapable shock : stability under varying conditions. Brain. Behav. Immun. 2:92-101; 1988.

Lawrence, D.A.; Kim, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. Toxicol. 142:189-201; 2000.

Li, T.; Harada, M.; Tamada, K.; Abe, K.; Nomoto, K. Repeated restraint stress impairs the antitumor T cell response through its suppressive effect on Th1-type CD4 T cells. Anticancer Res. 17:4259-4268; 1997.

Loperfido, S.; Monica, F.; Maifreni, L.; Paccagnella, A.; Famar, R.; Dal Pos, R.; Sartori, C. Bleeding peptic ulcer occurring in hospitalised patients: analysis of predictive and risk factors and comparison with out-of-hospital onset of haemorrhage. Dig. Dis. Sci. 39:698-705; 1994.

Ludwig-William, M.D.; Lipkin, M. Biochemical and cytological alterations in gastric mucosa of guinea pigs under restraint stress. Gastroenterol. 56:895-901; 1969.

Lysle, D.T.; Coussons, M.E.; Watts, V.J.; Bennett, E.H.; Dikstra, L.A. Morphine-induced alteration of immune status: dose dependency, compartment specificity and antagonism by naltrexone. J of Pharmacol. Exper. Ther. 265:1071-1078; 1993.

Madden, J.J.; Donahoe, R.M.; Zwemer,-Collins, J.; Shafer, D.A.; Falek, A. binding of naloxone to human T lymphocytes. Biochem Phamacol. 36:4103-4109; 1987.

Malamed, S. Ultrastructure of the mammalien adrenal cortex in relation to secretory function. In: Handbook of Physiology, Endocrinology (eds), Blascho, H.; sayers, G.; Smith, A.D.; American Physiol. Soci. Ed.; Washington, 4:25-39; 1975.

Marotti, T.; Gabrilovac, J.; Rabatic, S.; Smejkal-Jagar, L.; Rocic, B.; Haberstock, H. Met-enkephalin modulates stress-induced alterations of the immune response in mice. Pharmacol. Biochem and Behav. 54:227-284; 1996.

Marsland, A.L.; Muldoon, M.F.; Cohen, S.; Herbert, T.B.; Bachen, E.A.; Patterson, S.; Rabin, B.; Manuck, S.B. Lymphocyte subset redistribution mediating effects of hemoconcentration. Health. Psychol. 16:341-348; 1997.

McBlane, J.M.; Handley, S. Effects of two stressors on behaviour in the elevated X-maze: preliminary investigation of their interaction with 8-OHDPAT. Psychopharmacol.116:173-182; 1994.

McEnery, M.W.; Snowman, A.M.; Trifelitti, R.R & Snyder, S. H. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage–dependant anion chanel and the adenine nucleotide carrier. Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 3170-3174;1992.

Mehrichi, J.N.; Mills, I.H. Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. Clin Immunol Immunophathol. 27:240-249; 1983.

Meunier, J.M.; Shvaloff, A. Neurotransmetteurs. 2ème édition, Paris: Masson; 1992.

Millan, S.; Gonzalez-Quijano, Giordano M.L.; Soto, Martin A.I.; Lopez-Calderon, A. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. Life Sci. 59:1431-1442; 1996.

Millar, D.B.; Thomas, J.R.; Pacheco, N.D.; Rollwagen, F.M. Natural killer cell cytotoxicity and T-cell proliferation is enhanced by avoidance behavior. Brain. Behavior and Immunity. 7:144-153; 1993.

Miller, L.G.; Greenblatt, D.J.; Paul, S.M.; Shader, R.I. Benzodiazepine receptor occupancy in vivo: correlation with brain concentrations and pharmacodynamic action. J. Pharmacol. Exp. Ther. 240:516-522; 1986.

Miller, L.G.; Lee-Paritz, A.; Greenblatt, D.G.; Theoharides, T.C. High affinity benzodiazepine binding sites on rat peritoneal mast cells and RBL-1 cells: binding characteristics and effects on granule secretion. Pharmacol. 36:52-60; 1988.

Mills, P.J.; Berry, C.C.; Dimsdale, JE.; Ziegler, M.G.; Nelesen, R.A.; Kennedy, B.P. Lymphocyte subset redistribution in response to acute experimental stress: effects of gender, ethnicity, hypertension, and the sympathetic nervous system. Brain. Behav. Immun. 9:61-69; 1995.

Mills, P.J.; Dimsdale, J.E. Cardiovascular reactivity to psychosocial stressors : areview of the effects of b-blockade. Psychosomatics. 32:209-220; 1991.

Misslin, R.; Herzog, F.; Korch, B.; Roparz, P.H. Effects of isolation, handling and novelty on the pituitary-adrenal response in the mouse. Psyhoneuroendocrinol. 7:217-221; 1982.

Molina, P.E.; Hashiguchi, Y.; Meijerink, W.J.H.J.; Naukam, R.J.; Boxer, R.J.; Abumrad, N.N. Modulation of endogenous opiate production: effect of fasting. Biochemic. Biophysic. Resea communications. 207:312-317; 1995.

Molinego, R.; Canaleros, R. The staircase maze and the simple staircase in the analysis of the psychopharmacological action of CNS depressant. Pharmacol. 4:169-178; 1970.

Morgulis, M.S.F.A.; Rodrigues, P.M.; Palermo-Neto, J. Benzodiazepine receptors and avian macrophage activity: diazepam decreases spreading and phagocytosis. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 21:787-802; 1999.

Moftaqir-Handaj, A. Effet de l'exposition anténatale aux médicaments sur l'activité sympatho-adrénergique au cours du développement. Doctorat d'université: Sciences. Nancy; 1997.

Muldoon, M.F.; Herbert, T.B.; Patterson, S.M.; Kameneva, M.; Raible,R.; Manuck, S.B. Effects of acute psychological stress on serum lipid levels, hemoconcentration, and blood viscosity. Arch. Intern. Med. 155:615-620; 1995.

Munck, A.; Guyre, P.M.; Holbrook, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. Endocr Rev. 5:25-41; 1984.

Nair, M.P. ; Sarovoltz, L.D. ; Schwartz, S.A. Selective inhibitory effects of stress hormones on natural killer (NK) cells activity of lymphocytes from aids patients. Immuol. Invest. 24:689-699 ; 1995.

Naliboff, B.D.; Benton, D.; Solomon, G.F.; Morley, J.E.; Fahey, J.L.; Bloom, E.T.; Makinodan, T.; Gilmore, S.L. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. Psychosom. Med. 53:121-132; 1991.

Naveau, S. Définition des hémorragies gastroduodénales de stress (HGDS). Méthodes d'évaluation. Rean. Soin. Intens. Med. Urg. 4:246-248; 1988.

Novas, M.L.; Medina, J.H.; Calvo, D.; DeRobertis, E. Increase of peripheral-type benzodiazepine binding sites in kidney and olfactory bulb in acutely stressed rats. Eur. J. of Pharmacol. 135:243-246; 1987.

Nudmamud, S.; Siripurkpong, P.; Chindaduangratana, C.; Harnyuttanakorn, P.; Lotrakul,P.; Laarbboonsarp, W.; Srikiatkhachorn, A.; Kotchabhakdi, N.; Casalotti, S.O. Stress, anxiety and peripheral benzodiazepine receptor mRNA levels in human lymphocytes. Life Sci. 67:2221-2231; 2000.

Ogawa, K.; Hirai, M.; Katsube, T.; Murayama, M.; Hamaguchi, K.; Shimakawa, T.; Naritake, Y.; Hosokawa, T.; Kajiwara, T. Suppression of cellular immunity by surgical stress. Surgery. 127:329-336; 2000.

Okimura, T.; Nigo, Y. Stress and immune responses. Suppression of T cell functionin restraint-stressed mice. Immunopharmacol. 40:505-511; 1986.

Ovadia, H.; Nitsan, P.; Abramsky, O. Characterisation of opiate binding sites on membranes of rat lymphocytes. J Neuroimmunol. 21:93-102; 1989.

Pariante, C.M.; Carpiniello, B.; Germana Orru, M.; Sitzia, R., Piras, A.; Giulia Farci, A.M.; Sergio Del Giacco, G.; Piludu, G.; Miller, A.H. Chronic caregiving stress alters peripheral blood immune parameters: The role of age and severity of stress. Psychother. Psychosom. 66:199-207; 1997.

Pasternak, G.W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. Clin. Neuropharmac. 16:1-18; 1993.

Pattersson, S.M.; Matthews, K.A.; Allen, M.T.; Owens, J.F. Stress-induced hemoconcentration of blood cells and lipids in healthy women during acute psychological stress. Health Psychol. 14:319-324; 1995.

Payan, D.G.; Goetzel, E.J. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. J. Immunol. 135:783- 788; 1985.

Poirier, J.; Ribadeau-Dumas, J.L. Abrégé d'Histologie, 2ème édition, Paris : Masson; 1981.

Radulescu, R.T.; Decosta, B.R.; Jacobson, A.E.; Rice, K.C.; Blalock, J.E.; Carr, D.J.J. Biochemical and functional characterization of μ-opioid receptor binding site on cells of the immune system. Prog. Neuroendocrinimmunol. 4:166-179; 1991.

Ramseier, H.; Lichtensteiger, W.; Schlumf, M. *In vitro* inhibition of cellular immune responses by benzodiazepines and PK11195. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 15:557-582; 1993.

Raynard, B.; Nitenberg, G. Les ulcères gastro-duodénaux en réanimation. 2ème édition, Paris; 1996.

Reul, J.M.; Labeur, M.S.; Weigers, G.J.; Linthorst, A.C. Altered neuroimmunoendocrine communication during a condition of chronically increased brain corticotropin-releasing hormone drive. Ann. New York Acad. Sci. 840:444-445; 1998.

Rinner, I.; Schauenstein, K.; Mangge, H.; Porta, S.; Kvetnansky, R. Opposite effects of mild and severe stress on in vitro activation of rat peripheral blood lymphocytes. Brain. Behav. Immun. 6:130-140; 1992.

Rocca, P.; Bellone, G.; Benna, P.; Bergamasco, B.; Ravizza, L.; Ferrero, P. Peripheral-type benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor-like immunoreactivity distribution in human peripheral blood mononuclear cells. Immunopharmacol. 25:163-178; 1993.

Roit, I.M.; Brostoff, J.; Mâle, D.K. Immunologie. 4ème édition, Paris: Masson; 1997.

Rowse, G.J.; Weinberg, J.; Emerman J.T. Role of natural killer cells in psychosocial stressor-induced changes in mouse mammary tumor growth. Cancer. Res. 55:617-622; 1995.
Roy, S.; Loh, H.H. Effects of opioids on the immune system. Neurochemic. 21:1375-1386; 1996.

Ruff, M.R.; Pert, C.B.; Weber, R.J.; Whal, L.M.; Whal, S.M.; Paul, S.M. Benzodiazepine receptor-mediated chemotaxis of human monocytes. Sci. 229:1281-1283; 1985.

Sabbah, A. Allergologie et immunologie clinique. Paris: Editions Médicales Internationales; 1994.

Sanders, V.M. The role of norepinephrine and β-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2, and B lymphocyte function. Adv. Exp. Med?. Biol. 437:269-278; 1998.

Schedlowski, M.; Falk, A.; Rohne, A.; Wagner, T.O.F.; Jacobs, R.; Tewes, U.; Schmidt, R.E. Catecholamines induce alterations of distribution and activity of human natural killer 5NK) cells. J of Clin. Immunol. 13:344-351; 1993b.

Schedlowski, M.; Jacobs, R.; Stratmann ,G.; Richter, S.; Hädicke, A.; Tewes, U.; Wagner, T.O.F.; Schmidt, R.E. Changes of natural killer cells during acute psychological stress. J of Clin Immunol. 13:119-126; 1993c.

Scheldlowski, M.; Jacobs, R.; Alker, J.; Pröhl, F.; Stratmann, G.; Richter, S.; Hädicke,A.; Wagner, T.O.F.; Schmidt, R.E.; Tewes, U. Psychophysiological, neuroendocrine and cellular immune reactions under psychological stress. Neuropsychobiol. 28:87-90; 1993a.

Schlumpf, M.; Parmar, R.; Lichtensteiger, W. Prenatal diazepam induced persisting dowregulation of peripheral (omega 3) benzodiazepines receptors on rat splenic macrophages. Life Sci. 52: 927-934; 1993.

Sei, Y.; Yoshimoto, K.; McIntyre, T.; Skolnick, P.; Arora, P.K. Morphine induced thymic hypoplasia is glucocorticoid dependent. J. Immunol. 146:194-198; 1991.

Selye, H. A syndrome produced by divers nocuous agents. Nature, 138:32; 1936.

Shavit, Y.; Lewis, J.W.; Terman, G.W.; Gale, R.P.; Liebeskind, J.C. Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. Sci. 223:188-190; 1984.

Simiand, J.; Kean, P.E.; Morre, M. The staircase test in mice : a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. Psychopharmacol. 84:48-53; 1984.

Spry, C.J.F. Inhibition of lymphocyte recirculation by stress and corticotropin. Cell Immunol. 4:86-92; 1972.

Stefanski, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. Psychoneuroendocrinol. 25:389-406; 2000.

Tamada, K.; Harada, M.; Abe, K.; Li, T.; Nomoto, K. IL-4 producing NK1.1 + T cells are resistant to glucocorticoïd-induced apoptosis : implications for the Th1/Th2 balance. J. Immunol. 161:1239-1247; 1998.

Tischehler, A.S.; Delellis, R.A. The rat adrenal medulla.I. The normal adrenal. J. Amer. Coll. Toxicol. 7:1-21; 1988.

Vallée, M.; Mayo, W.; Maccari, S.; Le Moal.; M.; Simon H. Long terme effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion reponse. Brain. Res. 712:287-292; 1996.

Wang, J.K.; Morgan, J.I.; Spector, S. Benzodiazepines that bind at peripheral sites inhibit cell proliferation. Proc. Nalt. Acad. Sci. 81:753-756; 1984.

Wang, J.K.T.; Taniguchi, T.; Sagikura, M.; Spector, S. Presence of benzodiazepines binding sites in mouse thymocytes. Pharmacol. 23:160-161; 1981.

Waterman, M.R.; Simpson, E.R. Steroidogenic capacity in the adrenal cortex and its regulation. Prog. Drug. Res. 34:359-381; 1990.

Webster, E.L., Elenkov, I.J.; Chrousos, G.P. The role of corticotropin-releasing hormone in neuroendocrine –immune iteractions. Mol. Psychiatry. 2: 368-372; 1997.

Weizman, R.; Lehmann, J.; Leshiner, S.; Allmann, I.; Stoehr, T.; Heidbreder, C.; Domeney, A.; Feldon J.; Gavish M. Long lasting effect of early handling on the peripheral benzodiazepine receptor. Pharmacol. Biochem. Behav. 64:725-729; 1999.

Whal, S.M. ; Hunt, D.A.; Wong, H.L.; Dougherts, S.; McCartney-Francis, N.; Whal, L.M.; Elling Sworth, L.; Schmidt, J.A.; Hall, G.; Roberts, A.B.; Sporn, M.B. Transforming growth factor-□is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1 dent lymphocyte proliferation. J. Immunol.140:3026-3033; 1988.

Wichmann, M.W.; Zellweger, R.; Ayala, A.; Chaudry, I.H. Effects of naloxone on immune responses after hermorrhagic shock. Crit. Care. Med. 28:184-189; 2000.

Wu, W.; Yamaura, T.; Murakami, K.; Murata, J.; Matsumoto, K.; Watanabe, H.; Saiki, I. Social isolation stress enhanced liver metastasis of murine colon 26-L5 carcinoma cells by suppressing immune responses in mice. Life Sci. 66:1827-1838; 2000.

Yamagishi, H.; Kawaguchi, M. Characterization of central and peripheral-type benzodiazepine receptors in rat salivary glands. Biochem. Pharmacol. 55:209-214; 1998.

Yano, S & Harada, M. A method for the production of stress erosion in the mouse stomach and related pharmacological studies. Japan. J. Pharmacol. 23:57-64; 1973.

Yei, S.Y.; Corodetsky, C.W.; Krebs, H.A. Isolation and identification of morphine and normorphine 6-glucuronide as morphine metabolites in humans. J. Pharmacol. Sci. 66:1288-1292; 1977.

Zalcman, S.; Janda, A.; Ritcher, M.; Anisman, H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque forming cell response to sheep red blood cells. Brain. Behav. Immun. 2:254-266; 1988.

Zalcman, S.; Kerr, L.; Anisman, H. Immunosupression elicited by stressors and stressor related odors. Brain. Behav. Immun. 5:262-273; 1991.

Zavala, F. Benzodiazepines, anxiety and immunity. Pharmacol. Ther. 75:199-216; 1997.

Zavala, F.; Haumont, J.; Lenfant, M. Interaction of benzodiazepines with mouse macrophages. Eur. J. Pharmacol. 106:561-566; 1984.

PUBLICATION

Article publié en Mars 2001, Journal of Ethnopharmacology

Bousta, D.; Soulimani, R.; Jarmouni, S.; Belon, P.; Falla, J.; Froment, N.; Younos, C. Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L.; ans *Poumon histamine* in stressed mice. J of Ethnopharmacology. 74:205-215; 2001.

ELSEVIER

Journal of Ethnopharmacology 74 (2001) 205–215

Journal of ETHNO-PHARMACOLOGY

www.elsevier.com/locate/jethpharm

Neurotropic, immunological and gastric effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and *Poumon histamine* in stressed mice

D. Bousta [a], R. Soulimani [a,*], I. Jarmouni [a], P. Belon [c], J. Falla [b], N. Froment [d], C. Younos [a]

[a] *Laboratory of Pharmacology, University of Metz, 57000 Metz, France*
[b] *Laboratory of Immunology, IUT of Thionville, 57000 Thionville, France*
[c] *French Institute of Homeopathic Research, Ste-foy-lès Lyon, France*
[d] *Laboratory of Pathological Anatomy, CHR Metz, 57000 Metz, France*

Received 7 February 2000; received in revised form 5 September 2000; accepted 14 September 2000

Abstract

Previous studies realized in the laboratory have indicated that application of experimental stress (such as unavoidable footshock) induced significant behavioral, gastric and immunological alterations in mice. The aim of this study was to evaluate effects of low doses of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and *Poumon histamine* on stress-induced behavioral, immunological and gastric alterations. Locomotor, postural and exploratory activities have been evaluated by two behavioral tests: light/dark box and staircase tests. Immunological studies were investigated to count white blood cells subpopulations (lymphocytes, neutrophils, monocytes and basophils) by coulter counter. The severity of gastric erosions was evaluated by microscopic technique in mice after experimental stress. The results have demonstrated that low doses of *G. sempervirens* L. and *A. belladonna* L. had a significant neurotropic and protective effects on behavioral and gastric alterations induced by experimental stress. The immunological protective effects observed were probably induced via their neurotropic effects. The *P. histamine* showed a significant immunoprotective and gastroprotective effect in mice exposed to experimental stress. © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Stress; Behavior; Immunity; Gastric erosions; *Atropa belladonna* L.; *Gelsemium sempervirens* L.; *Poumon histamine*

1. Introduction

Stress (physic, chemic or psychosocial) represents the reaction of the body to stimuli that disturb its normal physiological equilibrium or homeostasis.

A major physiological response to stress is an activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Baxter and Tyrell, 1981), inducing an increase in circulating levels of β-endorphin, ACTH and glucocorticoids. These hormones have been shown to alter immune function (Flores et al., 1990).

Many authors have demonstrated that stressful events can alter the immune system (Schneiderman and Cabe, 1985; Kappel et al., 1991; Kusnecov et al., 1992; Dobbs et al., 1993; Ader et al., 1995). Other studies performed by Esterling and Rabin (1987) have found that stress influenced the immune response by different mechanisms; some of which are independent of adrenal corticosteroïd action. Furthermore immunocytochemical studies have demonstrated that lymphoid organs are innervated with nerve fibres containing classical neurotransmitter and neuropeptides (Walker and Codde, 1985; Felten et al., 1987).

In general it is assumed that acute and repeated stress in animal models as well as humans has been associated with a decrease in the leukocyte number which is due to a decrease in the number of the peripheral lymphocytes, whereas the neutrophils were unchanged after restraint stress exposure (Millan et al., 1996), other studies

* Corresponding author. Tel.: +33-3-87378505; fax: +33-3-87378506.
E-mail address: soulimani@zeus.univ-metz.fr (R. Soulimani).

0378-8741/01/$ - see front matter © 2001 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.
PII: S0378-8741(00)00346-9

(Rinner et al., 1992) also demonstrated a decrease in the number of leukocytes, associated with a shift decrease of the relative proportions of lymphocytes and neutrophils after exposure to immobilization.

In animals, experimental stress had been shown to induce various behavioral parameters changes, including decreases in general locomotor activity and exploratory behavior (Cabib and Puglisi-Allegra, 1996; Aloisi et al., 1997; Mitsushima et al., 1998).

Other works indicated that stress was involved in the development of gastric ulcer (Ludwig-William and Lipkis, 1969; Yano and Harada, 1973; Murakami et al., 1985; Redei et al., 1994). This include increase in release of acid and pepsin, decrease in mucus secretion, alterations in adrenal steroids and catecholamines, hypotension followed by ischemic damage in the gastric mucosa, and alterations in prostaglandin synthesis. Some of these events, if not all, appear to be controlled by the central nervous system (Hernandez, 1986).

The data sought to investigate the effects of *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L. and *Poumon histamine* in mice after stress exposure.

A. belladonna L. is a medicinal plant known for its sedative and local analgesic properties (Bezanger-Beauquesme et al., 1990; Valnet, 1992). The principle active compound is atropine (Demarque et al., 1995). It was also indicated that *A belladonna* L. possessed other properties as hypertensive (Abraham et al., 1981), antiarhythmic (Chadda et al., 1977), antiulcer and antiviral (Smith, 1983).

G. sempervirens L. is a medicinal plant which possesses also sedative and analgesic properties (Valnet, 1992). Principle Active compounds were: gelsemine, sempervirine and gelsemicine (Demarque et al., 1995).

P. histamine contains several inflammatory, and allergic mediators: such as histamine, leukotriene. it has been indicated to regulate allergic reaction mechanisms (Demarque et al., 1995).

The aim of present study was to further evaluate the pharmacological effects of *A. belladonna* L., *G. sempervirens* L. and *P. histamine* in stress-induced changes on behavioral, immune and gastric responses in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Male Swiss mice (Breeding R. Janvier, France), weighing between 38 and 44 g, 12 weeks of age at the time of testing, were used in all experiments. Mice were acclimatized to laboratory conditions for 14 days before being used. During this time animals were group-housed (five per box) in polypropylene boxes containing food and water ad libitum. The light cycle was automatically controlled (12 light/12 darkness) and room temperature adjusted to maintain 22 ± 2°C.

2.2. Preparation of products

A. belladonna L., *G. sempervirens* L. and *P. histamine* (obtained from Boiron laboratories). The doses of 5, 9 and 15 CH 'Centesimal hahnemaniennes', were prepared by centesimal dilution 1/100 (1 ml of product /99 ml of alcohol) and injected intraperitoneally (ip) 30 min before stress exposure ($n = 10$). Two Control groups (unstressed) were treated by an equal volume of these products or by NaCl 0.9%.

The preparations used in these experiments were:

- *P. histamine* is prepared from the lung of guinea pig sacrificed during a anaphylactic shock provoked artificially with ovalbumine.
- *G. sempervirens* L. is prepared from climbing shrub of the family of loganiaceae. The dying mother is essentially prepared from the root of the plant.
- *A. belladonna* L. is a plant of the family of solanaceae. The dying mother is prepared from the flowery complete plant. the majority of active principles are in sheets.

2.3. Procedure of stress

Each group of five mice was kept in shock boxes measuring $27.5 \times 24 \times 28.5$ cm, connected to a shock generator (Leitica, LE 100-26 shocker, generator France) and subjected to 300 unavoidable shocks (2 s/shock, 150 μA; 9 s intershock interval) (Zalcman et al., 1988). The control groups were composed of two groups: mice of the first group received NaCl 0.9% without stress, the second group received products without stress.

The stressed groups were composed by two groups: the first group received NaCl 0.9% 30 min before stress exposure, the second group received products 30 min before stress. All the animals were sacrificed 24 h after stress application. Time separating application of stress and animal sacrifice was kept constant (24 h).

2.4. Behavioral study

To study the effect of stress on behavior, two constraining tests were used to evaluate locomotor, exploratory and postural behavioral of mice.

2.4.1. Light/dark box test

2.4.1.1. Apparatus. The apparatus consisted of a Plexiglas box, divided in two compartments ($20 \times 20 \times 20$ cm) by a black Plexiglas partition, communicating with a small door, which the animal could easily pass, one of them was darkened, the other was illuminated (Crawley and Goodwin, 1980; Costall et al., 1989).

2.4.1.2. Procedure. Immediately after stress exposure, each subject was individually tested in five min sessions. Testing was performed between 14:00 and 17:00 h. Mice (previously stressed or not) were placed in the lit box to initiate the test session. The amount of time spent in the lit box was recorded in each time during 5 min after the first entry of mice in the dark box, the number of rears in the light side, and the number of transitions from dark to light side were recorded over 5 min.

2.4.2. Staircase test

2.4.2.1. Apparatus. The apparatus consisted of a Plexiglas enclosure (47 × 10 × 25 cm) with five identical steps. The only light source in the room was a 60 W desk lamp above the staircase (Simiand et al., 1984).

2.4.2.2. Procedure. The animals were individually placed on the floor of the box; the number of steps climbed and rears performed over a 5 min period were

Table 1
Effect of low doses of *Atropa belladonna* L. and *Gelsemium sempervirens* L. on leukocyte numbers in mice

		Lymphocytes	Neutrophils	Basophils	Monocytes
Unstressed saline-group					
0 CH	Mean ± S.E.M.	2.797 ± 0.126	0.844 ± 0.039	0.370 ± 0.05	1.632 ± 0.182
	% Variation	100%	100%	100%	100%
Stressed saline-group					
0 CH	Mean ± S.E.M.	2.012 ± 0.162°°	0.439 ± 0.026°	0.064 ± 0.005°°°	1.042 ± 0.018°°
	% Variation	72%	52%	17%	64%
Unstressed/treated Atropa belladonna *L. groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.600 ± 1.214	0.754 ± 0.254	0.560 ± 0.532+++	1.568 ± 0.189
	% variation	93%	89%	171%	96%
9 CH	Mean ± S.E.M.	2.800 ± 2.023	0.852 ± 0.065	0.260 ± 0.286++	1.698 ± 0.062
	% Variation	100%	100%	70%	104%
15 CH	Mean ± S.E.M.	3.125 ± 1.265	0.956 ± 0.059	0.689 ± 0.560+++	1.602 ± 0.253
	% Variation	112%	113%	186%	98%
Stressed/treated Atropa belladonna *L. groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.284 ± 0.169	1.61 ± 0.121***	0.111 ± 0.005***	1.811 ± 0.142***
	% variation	113%	366%	173%	173%
9 CH	Mean ± S.E.M.	2.509 ± 0.244*	1.434 ± 0.151***	0.087 ± 0.006**	1.119 ± 0.131
	% Variation	125%	326%	136%	107%
15 CH	Mean ± S.E.M.	1.509 ± 0.105*	0.371 ± 0.04	0.052 ± 0.005	1.341 ± 0.095*
	% Variation	75%	84%	81%	129%
Unstressed/treated Gelsemium sempervirens *L. groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.023 ± 0.235+	0.825 ± 0.023	0.231 ± 0.031++	1.225 ± 0.223+
	% Variation	72%	97%	62%	75%
9 CH	Mean ± S.E.M.	2.265 ± 0.285+	0.964 ± 0.059	0.352 ± 0.059	0.986 ± 0.060++
	% Variation	80%	114%	95%	60%
15 CH	Mean ± S.E.M.	2.850 ± 0.126	0.758 ± 0.063	1.380 ± 0.063	1.560 ± 0.092
	% Variation	101%	89%	102%	95%
Stressed/treated Gelsemium sempervirens *L. groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.341 ± 0.271	0.38 ± 0.06	0.057 ± 0.004	0.87 ± 0.087
	% variation	116%	86%	89%	84%
9 CH	Mean ± S.E.M.	1.933 ± 0.095	1.606 ± 0.116***	0.066 ± 0.008	1.135 ± 0.158
	% Variation	96%	366%	103%	109%
15 CH	Mean ± S.E.M.	2.592 ± 0.148**	0.82 ± 0.053***	0.137 ± 0.017***	1.17 ± 0.037
	% Variation	129%	187%	214%	112%

° $P<0.05$;
°° $P<0.01$;
°°° $P<0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice.
* $P<0.05$;
** $P<0.01$;
*** $P<0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice.
+ $P<0.05$;
++ $P<0.01$;
+++ $P<0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice.

Table 2
Effect of low doses of *Poumon histamine* on leukocytes number in stressed mice

		Lymphocytes	Neutrophils	Basophils	Monocytes
Unstressed saline-group					
0 CH	Mean ± S.E.M.	2.797 ± 0.126	0.844 ± 0.039	0.370 ± 0.050	1.632 ± 0.182
	% Variation	100%	100%	100%	100%
Stressed saline-group					
0 CH	Mean ± S.E.M.	2.012 ± 0.162°°	0.439 ± 0.026°	0.064 ± 0.005°°°	1.042 ± 0.018°°
	% Variation	72%	52%	17%	64%
Unstressed/treated Poumon histamine *groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.701 ± 0.205	0.952 ± 0.052	0.456 ± 0.056	1.758 ± 0.189
	% Variation	96%	112%	123%	107%
9 CH	Mean ± S.E.M.	2.986 ± 0.274	1.231 ± 0.265++	0.321 ± 0.052	1.702 ± 0.160
	% Variation	106%	145%	86%	104%
15 CH	Mean ± S.E.M.	3.902 ± 0.256++	1.023 ± 0.201	0.507 ± 0.026++	1.689 ± 0.231
	% Variation	139%	121%	137%	103%
Stressed/treated Poumon histamine *groups*					
5 CH	Mean ± S.E.M.	2.385 ± 0.208	1.857 ± 0.226***	0.176 ± 0.016***	1.414 ± 0.171*
	% Variation	118%	423%	275%	135%
9 CH	Mean ± S.E.M.	2.598 ± 0.229*	3.130 ± 1.612***	0.078 ± 0.004	1.607 ± 0.174**
	% Variation	129%	712%	122%	154%
15 CH	Mean ± S.E.M.	3.661 ± 0.148**	1.010 ± 0.045***	0.071 ± 0.009	1.600 ± 0.131***
	% Variation	182%	230%	110%	153%

° $P<0.05$;
°° $P<0.01$;
°°° $P<0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice.
* $P<0.05$;
** $P<0.01$;
*** $P<0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice.+ $P<0.05$;
++ $P<0.01$;+++ $P<0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice.

recorded. A step was considered as being climbed when the mouse had placed all four paws on a step. The number of steps descended was not taken into account in order to simplify the observations. After each test session, the box was cleaned to eliminate any olfactory cue which might effect the next animal's behavior.

2.5. Immunological study

Mice were anaesthetized 24 h after stress exposure with an intraperitoneal injection of pentobarbital (Sanofi, France), 6% diluted at 1/10 in the NaCl 0.9%. Blood was then collected in heparinized tubes by heart puncture.

2.5.1. White blood cells counts (WBC)

Total concentration of WBC in peripheral blood were determined using a coulter counter (Technicon H-2).

2.6. Microscopically studies

The severity of gastric erosions in stressed mice and effects of different products.

Twenty-four hours after stress, the abdominal cavity was opened, and the stomach was immediately removed, opened along the greater curvature and washed with solution of tyrode (NaCl: 8 g/KCl: 0.2 g/$MgCl_2$: 0.1 g/$NaHCO_3$: 1 g/$CaCl_2$: 0.2 g/Na_2HPO_4: 0.05 g/glucose: 1 g distilled water: 1000 ml).

The mucosal side of the stomach was photographed by a microscopical apparatus equipment (Nikon FDX-35.Labophot). The severity score of mucosal erosions was calculated as the summation of the lent of erosions (Yano and Harada, 1973). Protective action of the products on the severity score of gastric erosions was calculated using the following fomula:

$$\text{Protection } (\%) = a - b/a \times 100$$

where a is the mean severity score of gastric erosions of stressed saline group; b is the mean severity score of gastric erosions of treated and stressed group.

2.7. Statistical analysis

Data are expressed as means ± S.E.M., statistical differences were calculated by one way ANOVA, followed by Student–Newman–Keuls post hoc analyses.

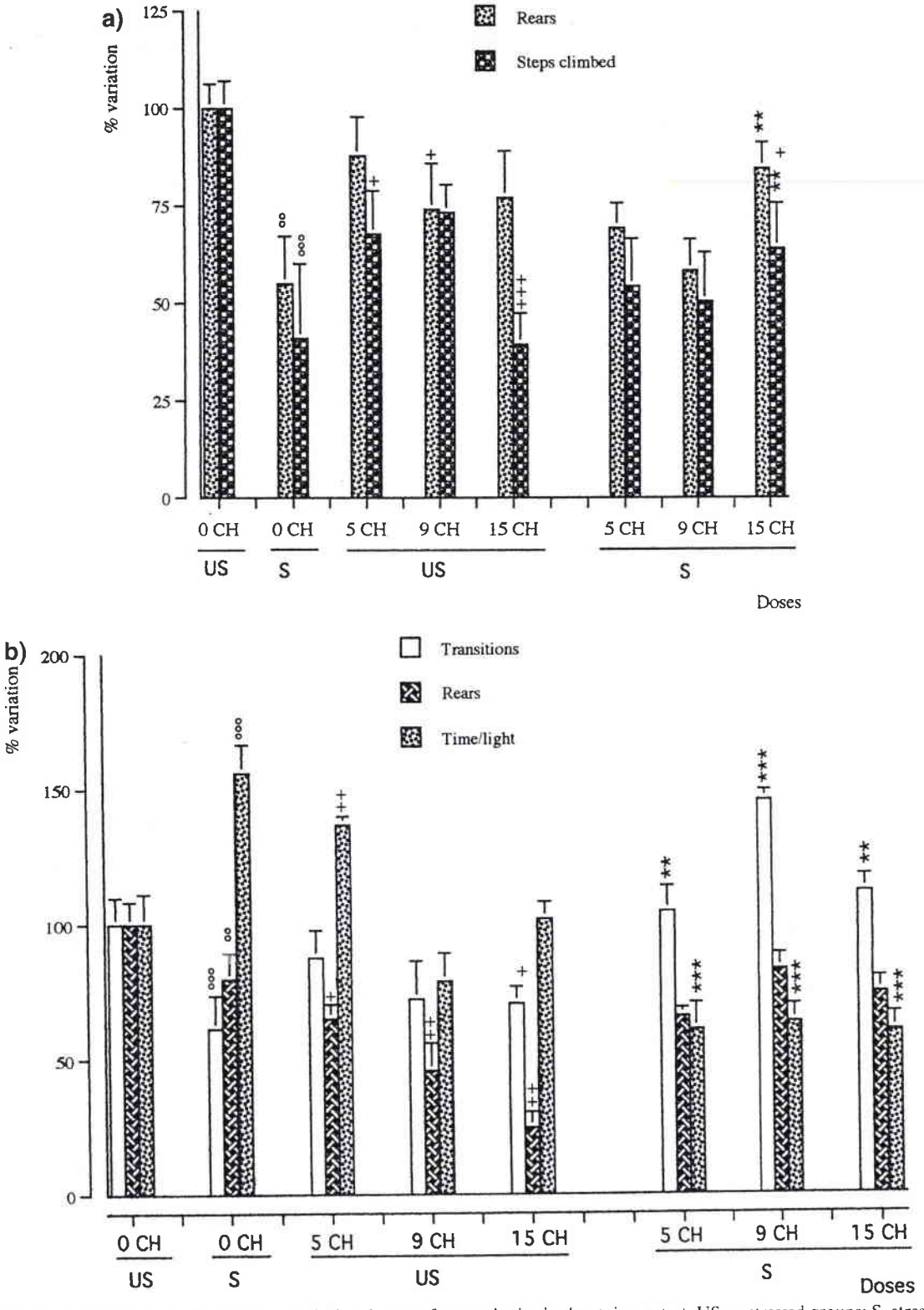


Fig. 1. (a) Effect of *Atropa belladonna* L. on steps climbed and rears of stressed mice in the staircase test. US. unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; + + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice. (b) Effect of *A. belladonna* L. on transition, rears and time spent in the lit compartment of the light/dark box test in stressed mice. US, unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; + + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice.

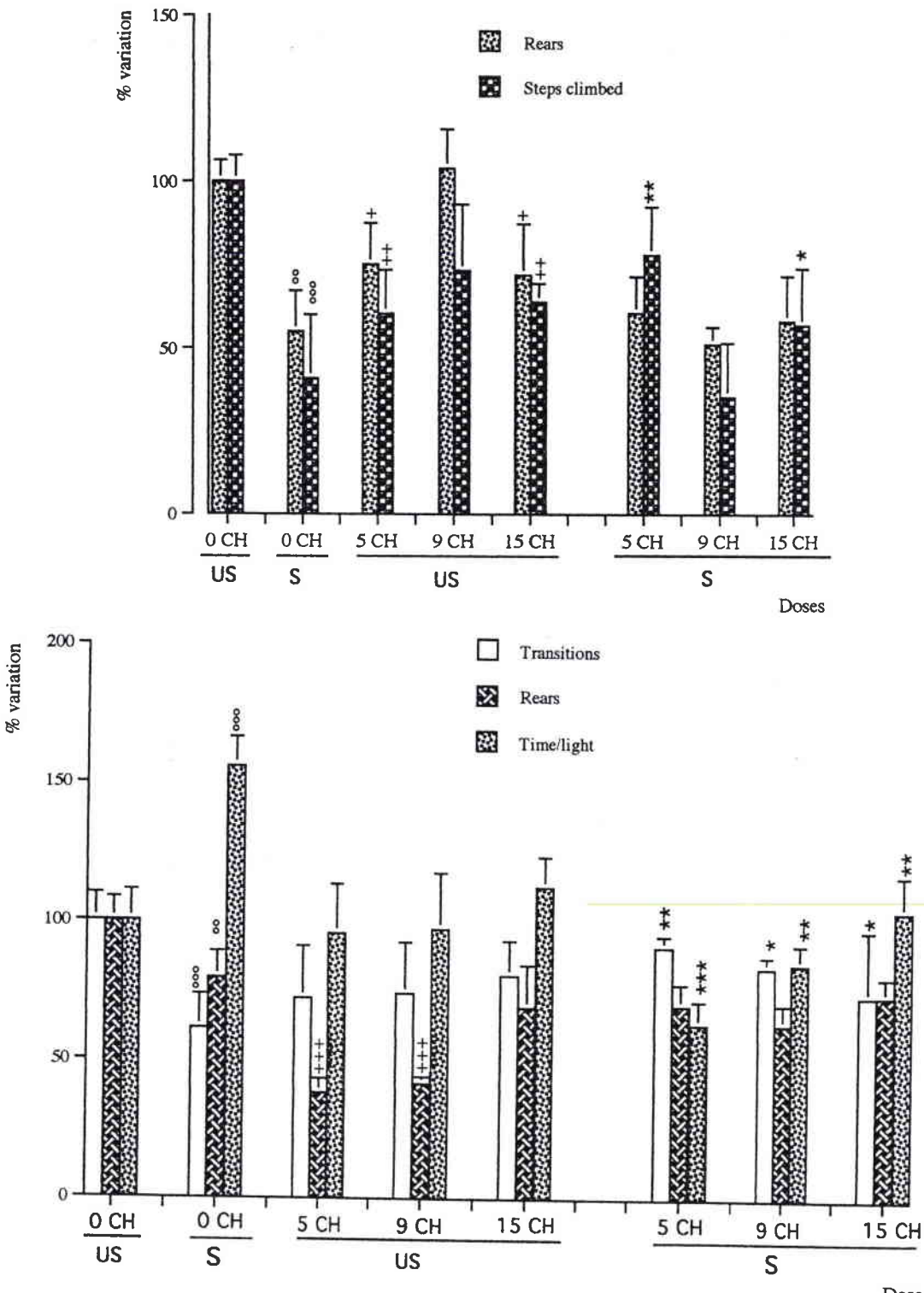


Fig. 2. (a) Effect of *Gelsemium sempervirens* L. on steps climbed and rears of stressed mice in the staircase test. US, unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; + + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice. (b) Effect of *G. sempervirens* L. on transitions, rears and time spent in the lit compartment of the light dark box test in stressed mice. US, unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; − + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice.

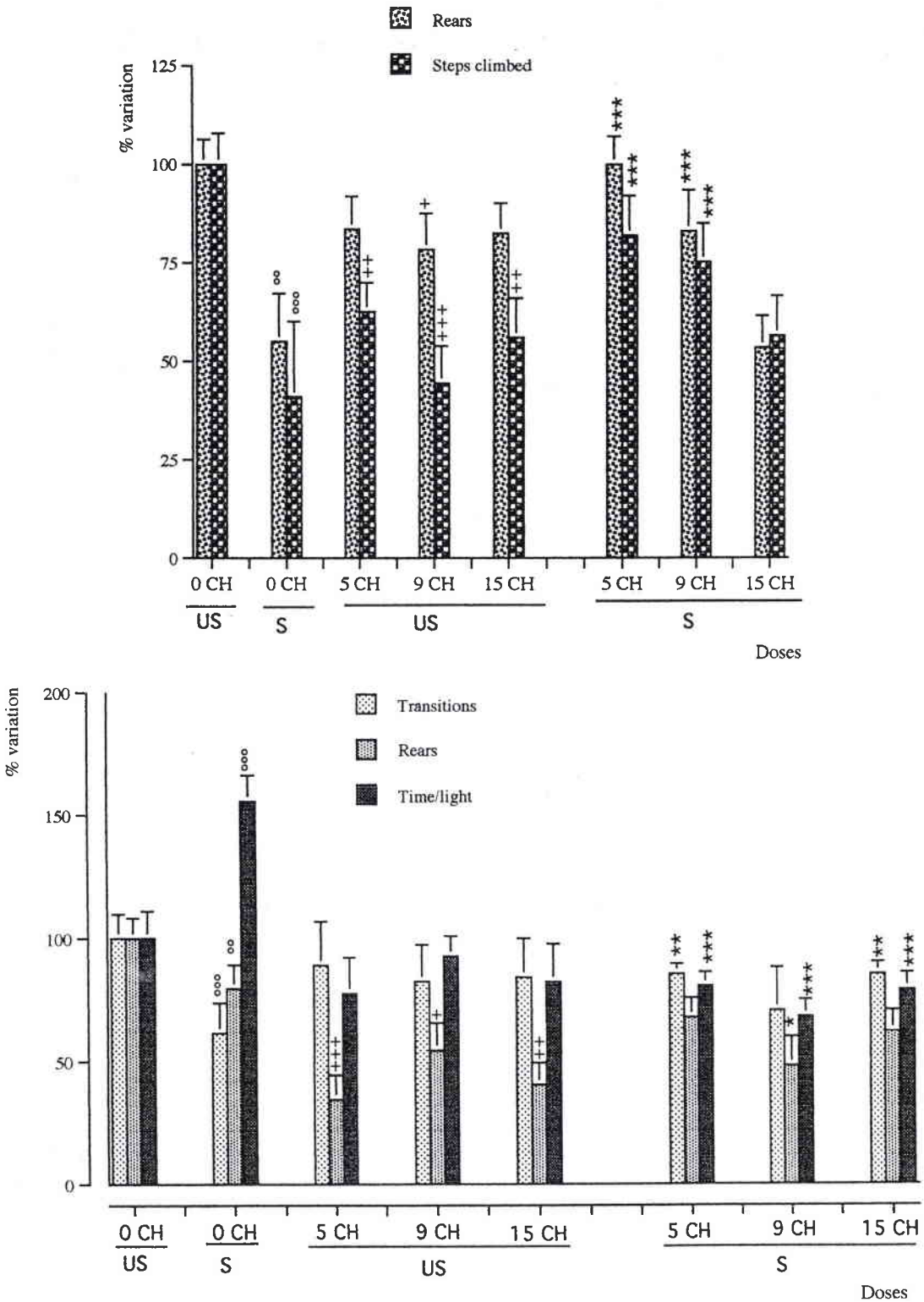


Fig. 3. (a) Effect of *Poumon histamine* on steps climbed and rears of stressed mice in the staircase test. US, unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; + + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice. (b) Effect of *P. histamine* on transitions, rears and time spent in the lit compartment of the light/dark box test in stressed mice. US, unstressed groups; S, stressed groups. $N = 10$. ° $P < 0.05$; °° $P < 0.01$; °°° $P < 0.001$; stressed-saline compared to unstressed-saline mice. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; stressed-treated compared to stressed-saline mice. + $P < 0.05$; + + $P < 0.01$; + + + $P < 0.001$; unstressed-treated compared to unstressed-saline mice.

Differences between means were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Behavioral studies

3.1.1. A. belladonna

As shown in Fig. 1a, the experimental stress induced a significant decrease in both mice rears and steps climbed in the staircase test (45 and 59%; $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively) compared to the unstressed-saline group, in this same behavioral paradigm,

A. belladonna was able to reverse the effects of stress on these behavioral parameters, this effect was significant only at 15 CH of *A. belladonna* (rears: 52%, $P < 0.01$; steps climbed 56%; $P < 0.01$). However, the unstressed and treated mice with 5 and 15 CH showed a significant decrease on steps climbed number (32 and 60%; $P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). Whereas, the number of rears decreased only at 9 CH (26%, $P < 0.01$).

In the light/dark box test, the stress applied to mice induced a significant increase in the time spent in the lit compartment (55%, $P < 0.001$), whereas it decreased the number of transitions from dark to lit side and rears (40 and 28%; $P < 0.001$ and $P < 0.01$, respectively) compared to the unstressed-saline group.

All doses of *A. belladonna* failed to have any effect on rears compared to the stressed-saline group in the light/dark box test.

However, *A. belladonna* reversed the effect of stress on transitions and time spent in lit compartment at

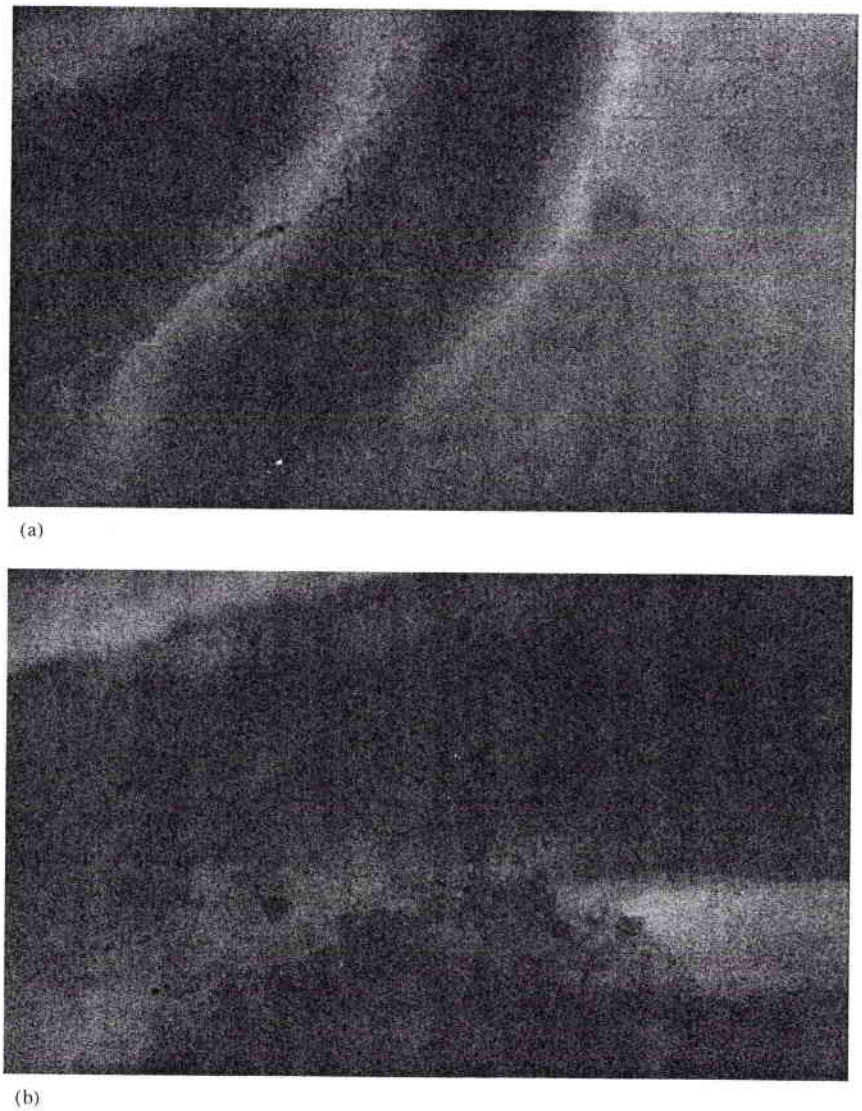


Fig. 4. (a) Microphotograph of the stomach villosity displays a few gastric erosions 'red points' (× 60). (b) Micrographs of the stomach of stressed mouse (× 32). Severe gastric erosions are observed after stress exposure.

Table 3
Effects of *Atropa belladonna* L, *Gelsemium sempervirens* L. and *Poumon histamine* on the severity of gastric erosions in stressed mice[a]

	No. animals	Mean severity score ± S.E.M.[b]	$P<$	Protection (%)
Unstressed saline-group				
0 CH	5	2.677 ± 0.211	///	///
Stressed saline-group				
0 CH	5	8.111 ± 0.511	0.001	///
Unstressed/treated Atropa belladonna *L. groups*				
5 CH	5	2.250 ± 2.020	0.03	16
9 CH	2	2.020 ± 1.050	0.004	21
15 CH	5	4.023 ± 1.022	0.01	No protection
Stressed/treated Atropa belladonna *L. groups*				
9 CH	5	1.532 ± 0.417	0.001	81
15 CH	5	9.100 ± 0.231	NS	No protection
Unstressed/treated Gelsemium sempervirens *L. groups*				
5 CH	5	3.560 ± 1.036	0.02	No protection
9 CH	5	2.050 ± 0.206	0.005	23
15 CH	5	2.560 ± 1.086	NS	12
Stressed/treated Gelsemium sempervirens *L. groups*				
5 CH	5	2.667 ± 0.546	0.001	67
9 CH	5	5.047 ± 0.801	0.001	38
15 CH	5	3.500 ± 0.128	0.001	57
Unstressed/treated Poumon histamine *groups*				
5 CH	5	3.677 ± 2.030	0.01	No protection
9 CH	5	4.266 ± 1.230	0.001	No protection
15 CH	5	3.023 ± 2.120	0.03	No protection
Stressed/treated Poumon histamine *groups*				
5 CH	5	2.500 ± 0.289	0.001	69
9 CH	5	4.050 ± 1.470	0.01	50
15 CH	5	4.020 ± 1.230	0.01	50

[a] NS: not significant.
[b] The severity score of gastric erosions per stomach was calculated as the summation of the length of erosions

these same doses, i.e. it increased transitions number (70, 137 and 81%; $P<0.01$, $P<0.001$ and $P<0.01$) and reduced time spent in the lit compartment (62, 60 and 62%; $P<0.001$, $P<0.001$ and $P<0.001$). These effects were shown to be significant at all doses of *A. Belladonna* L. compared to the stressed-saline group. Whereas the unstressed mice treated with 5, 9 and 15 CH showed a dose dependant decrease on rears number (35, 54 and 75%; $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively). However, the time spent in the light compartment increased significantly at 5 CH of *A. belladonna* L. (37%, $P<0.01$) (see Fig. 1b).

3.1.2. G. sempervirens

As indicated in Fig. 2a, *G. sempervirens* at 5 and 15 CH caused a significant increase in steps climbed in the staircase test (91 and 39%; $P<0.01$ and $P<0.05$) compared to stressed-saline group. Whereas, the same doses 5 and 15 CH of this product decreased both steps climbed and rears numbers in unstressed mice (steps climbed: 39 and 36%; $P<0.01$ and $P<0.01$; rears: 25 and 28%; $P<0.05$ and $P<0.05$).

In the light/dark box test, *G. sempervirens* caused a significant increase of transitions at 5, 9 and 15 CH (48, 36 and 19%; $P<0.01$, $P<0.05$ and $P<0.05$, respectively). In contrast, at the same doses, it decreased significantly the time spent in the lit compartment (60, 46 and 34%; $P<0.001$, $P<0.01$ and $P<0.01$, respectively), compared to stressed-saline group, whereas it caused no effect on number of rears at all doses. However, a decrease was observed only on rears number in unstressed mice treated with 5 and 9 CH compared to the unstressed-saline mice (62 and 59%; $P<0.001$ and $P<0.001$, respectively) (Fig. 2b).

3.1.3. P. histamine

In the staircase test (Fig. 3a), one observed that number of rears and steps climbed increased significantly in mice treated by 5 and 9 CH of *P. histamine* in the staircase test (rears: 81 and 51%; $P<0.001$ and $P<0.001$; steps climbed: 100 and 83%; $P<0.001$ and $P<0.001$). However, the unstressed groups treated with 5, 9 and 15 CH of this product showed a significant decrease on steps climbed number (37, 55 and 44%; $P<0.01$, $P<0.001$ and $P<0.01$, respectively) but the number of rears decreased only in mice treated with 9 CH of *P. histamine* compared to the unstressed-saline group (22%, $P<0.05$).

As shown in Fig. 3b, it was observed that *P histamine* at 5 and 15 CH reversed the effects of stress on mice, i.e. it decreased the time spent in the lit compartment (48 and 50%; $P<0.001$ and $P<0.001$, respectively) and increased the number of transitions (38 and 39%; $P<0.01$ and $P<0.01$, respectively). In contrast, 9 CH of *P. histamine* the decreased rears number (33%, $P<0.05$).

Also observed in Fig. 3b that the unstressed mice treated with 5, 9 and 15 CH showed a significant decrease on rears number compared to unstressed-saline mice (65, 45 and 60%; $P<0.001$, $P<0.05$ and $P<0.01$, respectively).

3.2. Immunological studies

3.2.1. White blood cells counts

3.2.1.1. A. belladonna L.. As shown in Table 1, the lymphocytes, neutrophils, basophils and monocytes numbers has significantly decreased after stressor exposure compared to the unstressed-saline group.

It was also observed that in stressed treated group *A. belladonna* L. at 9 CH showed a slight and significant increase of lymphocytes number, whereas 15 CH of this same product decreased significantly the number of lymphocytes. Neutrophils and basophils numbers were

strongly increased in stressed and treated mice with 5 and 9 CH of *A. belladonna* L. Whereas the number of monocytes was increased significantly in stressed and treated mice with 5 CH and 15 CH of *A. belladonna* L. However, one observed in Table 1 that the unstressed treated mice with 5 and 15 CH showed a significant increase on basophils number. On the contrary, 9 CH of this product decreased the number of basophils compared to unstressed-saline mice.

3.2.1.2. G. sempervirens L./. Table 1 showed an important increase of lymphocytes number in stressed treated group at 15 CH of *G. sempervirens*. L. A significant increase in neutrophil numbers was observed at 9 and 15 CH. Whereas a significant increase in basophil number was observed only at 15 CH of *G. sempervirens* L. compared to stressed-saline group. However, it caused no effect in monocytes number at all doses.

The unstressed mice treated with 5 and 9 CH decreased significantly the lymphocytes and monocytes numbers, but only 5 CH caused a significant decrease on basophils number compared to the unstressed-saline group.

3.2.1.3. P. histamine. As shown in Table 2, a significant increase of lymphocytes number in stressed treated group at 9 and 15 CH of *P histamine* was observed. However, a significant increase of basophils number was noted at 5 CH. At all doses of *P. histamine* a significant increase of monocytes and neutrophils numbers were observed compared to stressed-saline group. In the unstressed treated group with 15 CH of *P. histamine*, a significant increase of lymphocyte and basophil numbers was noted but only 9 CH of this product increased the number of neutrophils compared to unstressed-saline group.

3.3. Microscopical studies

The number of erosions per stomach increased after stress application compared to the unstressed-saline group (Fig. 4a and b).

Table 3 showed a significant decrease of gastric erosions in stressed mice after treatment with *A. belladonna* L. at 9 CH, a marked decrease of gastric erosions after treatment was also observed with *G. sempervirens* L. and *P. histamine* at all doses, the greatest protection on the severity of gastric erosions was observed in stressed mice treated with 5 CH of *P. histamine* and *G. sempervirens* L. One also observed in Table 2 that 9 CH of *A. belladonna* L. and *G. sempervirens* L. decreased significantly the gastric erosion in unstressed treated group. In contrary, the unstressed mice treated with *A. belladonna* L. at 15 CH and *G. sempervirens* L. at 5 CH increased the gastric erosions compared to unstressed-saline mice. One observed also an increase in the gastric erosions at all doses of *P. histamine* (Table 4).

4. Discussion and conclusions

In this study, the effects of low doses of *A. belladonna* L., *G. sempervirens* L. and *P. histamine* were investigated on stress-induced alterations on behavior, immune and gastric systems in mice.

As shown in this study, *A. belladonna* L. was able to reverse effects of stress on behavior, this may be related to an anxiolytic-like effect of *A. belladonna* L., which abolished the behavioral inhibition induced by the experimental stress. *G. sempervirens*. L., also showed an anxiolytic like effect on stressed mice particularly at 5 CH.

The results demonstrated that 5 CH and 15 CH of *P. histamine* present the same effects on behavior at it was seen with *A. belladonna* L. and *G. sempervirens* L.

Immunological studies demonstrated that all these three products were able to reverse the effects of stress on different leukocyte subpopulations. However, this protective effect was largely apparent after treatment with *P. histamine*.

Gastric erosions appeared to be lower in the stressed-saline group after treatment with *G. sempervirens* L. and *P. histamine* at all doses. Whereas, *A. belladonna* L. was effective on the severity of gastric erosions only at 9 CH in stressed mice.

In summary, the data presented in this work showed that *A. belladonna* L. at 9 CH and *G. sempervirens* L. at 5 and 15 CH have an immunoprotective and gastroprotective properties. These effects are probably associated to their neurotropic, anxiolytic-like effects. Immunoprotective effect of *P histamine* at all doses is probably associated with its pharmacological properties on the immune system, with neurotropic effect as second effect.

References

Aloisi, A.M., Casamenti, F., Scali, C., Pepeu, G., Carli, G., 1997. Effect of novelty, pain and stress on hippocompal extracellular acetylcholine levels in male rats. Brain Research 748, 219–226.

Abraham, S., Cantore, H., Spector, S., 1981. Studies on the hypotensive response to atropine in hypertensive rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 218, 662–668.

Ader, R., Cohen, N., Felten, D., 1995. Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. The Lancet 345, 99–103.

Baxter, J., Tyrell, J., 1981. The adrenal cortex. In: Gelig, P., Baxter, J., Broadus, A., Froan. A. (Eds.). Endocrinology and Metabolism. Mc Graw Hill. New York, pp. 510–550.

Bezanger-Beauquesme, L., Pinkas, M., Tork, M., Trotin, F., 1990. Plantes médicinales des régions tempérées, 2nd edition. Maloine, Paris.

Cabib, S., Puglisi-Allegra, S., 1996. Repeated and chronic stress promide opposite genotype-dependant neuronal and behavioral alterations. Meeting of European Neurosciences, Strasbourg.

Chadda, K.D., Lichstein, E., Crupta, P.K., Kourtesis, P., 1977. Effects of atropine in patients with bradyarrhythma complicating

myocardial infarction usefulness of an optimum dose for overdrive. American Journal of Medicine 63, 503–510.

Costall, B., Jones, B.J., Kelly, M.E., Naylor, R.J., Tomkins, D.M., 1989. Exploration of mice in a black and white test box: validation of model of anxiety. Pharmacology Biochemistry and Behavior 32, 777–785.

Crawley, J.N., Goodwin, U.K., 1980. Preliminary report of a simple animal behavior model for anxiolytic effects of benzodiazepines. Pharmacology Biochemistry and Behavior 13, 167–170.

Demarque, D., Jouanny, J., Poitevin, B., Sainy-Jean, Y., 1995. Pharmacologie et matière médicale homéopathique, 2nd edition. Boiron, C.E.DH, France.

Dobbs, C.M., Vasques, M., Glaser, R., Sheridan, J.F., 1993. Mechanism of stress induced modulation of viral pathogenesis and immunity. Journal of Neuroimmunology 48, 151–160.

Esterling, B., Rabin, B.S., 1987. Stress-induced alteration of T lymphocyte subset and humoral immunity in mice. Behavioral Neuroscience 101, 115–119.

Felten, D.L., Ackerman, K.D., Wiegand, S.J., Felten, S.Y., 1987. Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen. I nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. Journal of Neuroscience Research 18, 28–36.

Flores, C.M., Hernandez, M.C., Hargreaves, K.M., Bayer, B.M., 1990. Restraint stress-induced elevations in plasma corticosterone and (endorphin are not accopanied by alterations in immune function. Journal of Neuroimmunology 28, 219–225.

Hernandez, D.E., 1986. Neuroendocrine mechanisms of stress ulceration: focus on thyrotropin-releasing hormone (TRH). Life Sciences 39, 279–296.

Kappel, M., Tvede, N., Galbo, H., Harar, P.M., Kjaer, M., Linstow, M., Klarlund, K., Pedersen, B.K., 1991. Evidence that the effect of physical exercise on NK activity is mediated by epinephrine. Journal of Applied Physiology 70, 2530–2534.

Kusnecov, A.V., Grota, L.J., Schmidt, B., Bonneau, R.H., Scheridan, J.F., Glaser, J.K., Moynihan, J.A., 1992. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. Neuroimmunology 38, 129–138.

Ludwig-William, M.D., Lipkis, M., 1969. Biochemical and cytological alterations in gastric mucosa of Guinea pigs under restraint stress. Gastroenterology 56, 895–901.

Millan, S., Gonzalez-Quijano, L., Giordano, M., Soto, L., Martin, A.I., Lopez-Calderon, A., 1996. Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. Life Sciences 59, 1431–1442.

Mitsushima, D., Yamanoi, C., Kimura, F., 1998. Restriction of environmental space attenuates locomotor activity and hippocampal acetylcholine release in male rats. Brain Research 805, 207–212.

Murakami, M., Lam, S.K., Inada, M., Mizaki, T., 1985. Pathophysiology and pathogenesis of acute gastric mucosal lesions after hypothermic restraint in rats. Gastroenterology 88, 660–665.

Redei, E., Pare, W.P., Aird, F., Kluczynski, J., 1994. Strain differences in hypothalamic-pituitary adrenal activity and stress ulcer. American Journal of Physiology 266, 353–360.

Rinner, I., Schauenstein, K., Mangge, H., Porta, S., Kvetnansky, R., 1992. Opposite effects of mild and severe stress on in vitro activation of rat peripheral blood lymphocytes. Brain. Behavior and Immunity 6, 130–140.

Schneiderman, N., Cabe, P.M., 1985. Biobehavioral responses to stressors. In: Field, T.M., Cabe, P.M., Schneiderman, N. (Eds.), Stress and Coping. Laurence Airbrone, Hillsdale, NJ, USA, pp. 13–61.

Smith, J.A., 1983. The effects of atropine, cimetidine and FPL 52694 on duodenal ulcers in mice. European Journal of Pharmacology 88, 215–221.

Simiand, J., Kean, P.E., Morre, M., 1984. The staircase test in mice: a simple and efficient procedure for primary screening of anxiolytic agents. Psychopharmacology 84, 48–53.

Valnet, J., 1992. Phytothérapie. 6th edition. Maloine, Paris.

Walker, R., Codde, E., 1985. Neuroimmunomodulatory interactions of norepinephrine and serotonin. Journal of Immunology 10, 41–58.

Yano, S., Harada, M., 1973. A method for the production of stress erosion in the mouse stomach and related pharmacological studies. Japanese Journal of Pharmacology 23, 57–64.

Zalcman, S., Janda, A., Ritcher, M., Anisman, H., 1988. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque forming cell responses to sheep red blood cells. Brain Behavior and Immunity 2, 254–266.

ANNEXE TECHNIQUE

Dans le but d'évaluer les effets du stress physique sur le taux de la β endorphine (hormone de stress et de douleur). Nous avons entrepris une étude expérimentale comparative chez des animaux isolés ou stressés physiquement, dans laquelle nous avons mis au point une technique immunohistochimique sur le tissu hypophysaire par le biais d'un marquage Streptavidine-Peroxydase. Nous avons constaté chez les deux types d'animaux stressés par isolement social ou par stress physique, la même intensité de marquage et surtout la même localisation de l'hormone (au niveau de quelques cellules opiocorticotropes et la majorité de l'hormone se situe au niveau des vaisseaux sanguins).

I. Détermination du taux de la β endorphine au niveau de l'antéhypophyse de l'animal: **Immunohistochimie**

I-1. Rappel de la technique immunohistochimique : immunomarquage streptavidine-biotine peroxydase

L'immunohistologie est une technique destinée à mettre en évidence certains constituants cellulaires et tissulaires ayant des propriétés antigéniques ; il s'agit de techniques de révélation des antigènes intracellulaires par des anticorps marqués par des enzymes (la peroxydase par exemple). Cette technique se résume dans ce schéma suivant : voir Fig. (principe de la technique).

Ainsi, l'immunohistochimie, quelque soit l'antigène recherché, suivra toujours le même mode opératoire, et seule la spécificité de l'anticorps changera, le protocole opératoire est le suivant :

1) Déparaffinage et montage des coupes à l'eau (Voir paragraphe coupes histologiques).

2) Démasquage antigénique

Les antigènes, du fait des modifications conformationnelles de l'épitope liées à la fixation, ne sont plus reconnus par les anticorps correspondants après inclusion en paraffine. Cette étape aboutit à un démasquage de fonctions normalement non accessibles aux réactifs histochimiques : ce démasquage est lié à la dénaturation de protéines globulaires qui s'accompagne d'un déplissement de la molécule et donc l'apparition en surface de groupes normalement enfouis à l'intérieur de l'édifice moléculaire globulaire. Différentes méthodes de démasquage sont possibles (chimique, enzymatique ou thermique), mais la restauration antigénique de la chaleur reste la plus fiable pour donner les meilleurs résultats.

Cette dernière est la plus utilisée, et a permis d'augmenter considérablement le nombre d'anticorps utilisables sur coupes en paraffine, son optimisation est assurée par le contrôle de 4 paramètres :

- **La température**: à laquelle il est effectué : plus elle est élevée , et plus le démasquage est rapide et efficace.

- **Le pH de la solution de démasquage**: pour la grande majorité des anticorps, l'intensité du marquage est peu influencé par le pH de la solution ; il apparaît que les anticorps fonctionnels après démasquage thermique répondent en quasi totalité à un prétraitement dans un tampon citrate 10 mM à pH 6 (ou plus élevé).

- **La nature de la solution de démasquage** : 4 solutions ont prouvé leur efficacité : l'urée 10 mM, le tampon citrate à 10 mM (pH6) et l'EDTA à 10 mM (pH 8) ; ces deux derniers offrent une grande sensibilité de marquage et une grande reproductibilité.

- **Durée de démasquage**: Pour certains antigènes, un gain de signal est obtenu avec un temps de démasquage prolongé.

3) Inhibition des activités enzymatiques endogènes

Certaines cellules contiennent naturellement des peroxydases pouvant engendrer une fausse positivité lors de la révélation, afin de bloquer leur activité, il faudra en début de la technique immerger les lames en eau oxygénée à 3 % (substrat des péroxydases).

4) Incubation avec l'anticorps primaire.

5) Incubation avec l'anticorps secondaire marqué à la peroxydase.

6) Révélation avec le substrat de l'enzyme.

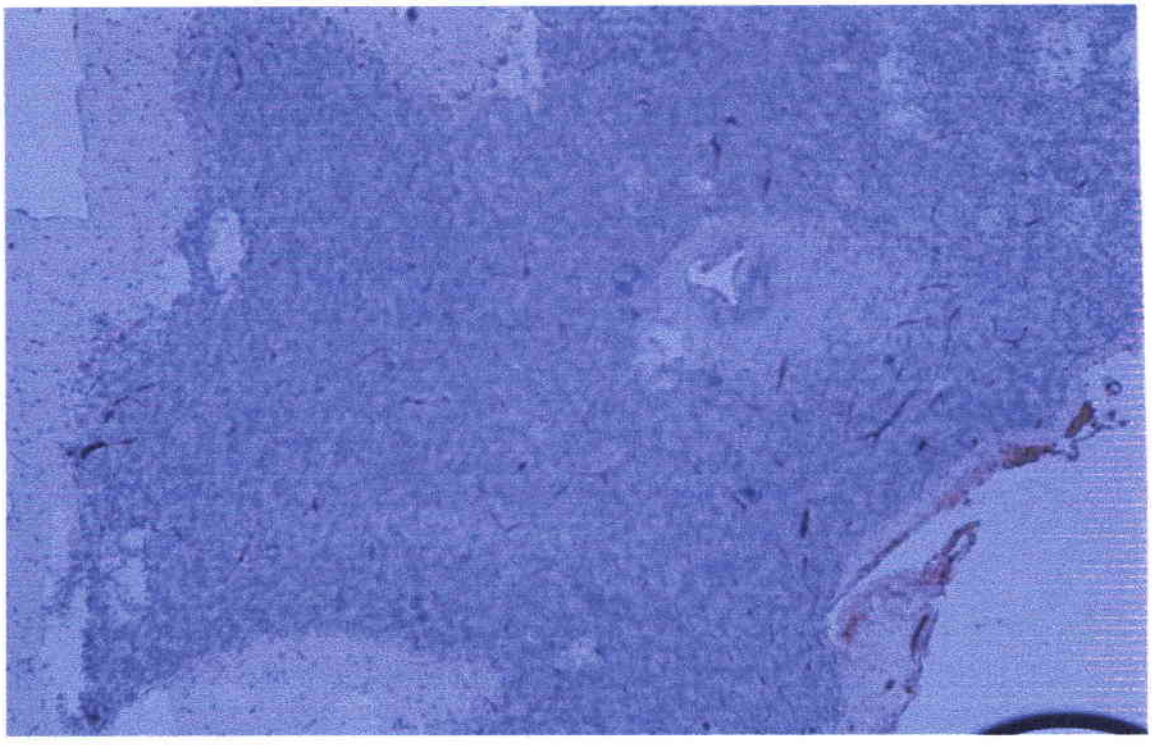
7) Contre coloration et montage des lamelles.

a) *Réactifs utilisés*

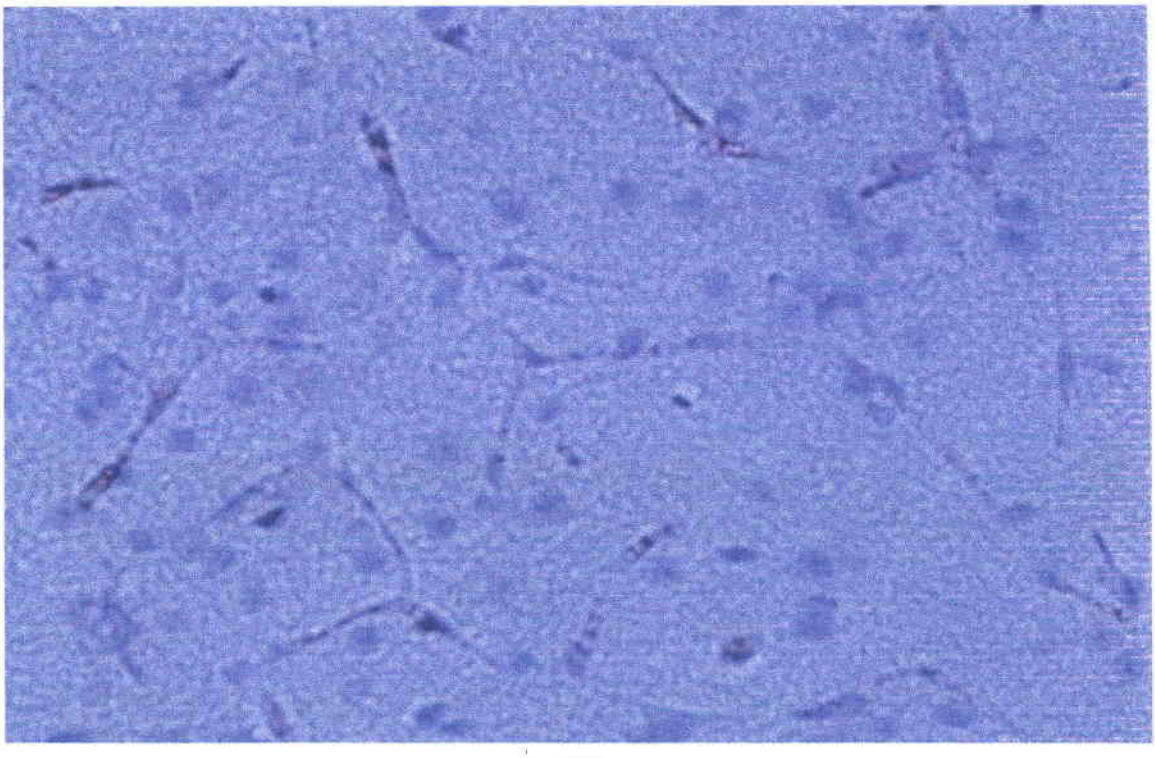
- Toluène neuf.
- Alcool absolu, alcool 95°c.
- Eau distillée, eu courante, eau chaude.
- Tampon Tris 0.5 M, pH 7.6.
- Tampon citrate 10 mM, pH 6.
- Eau oxygénée à 3 %.
- hématoxyline de Harris.
- Comprimés de DAB (Sigma).
- Sérum normal de chèvre (dilué au 1/5ème)
- Anticorps primaire polyclonal anti-βendorphine (lapin) (Euromedex).
- Anticorps secondaire biotinylés chèvre anti-lapin (DAKO).
- Système de révélation (DAKO) : complexe streptavidine-biotine conjugué à la peroxydase.
- Substrat chromogène (Sigma) : 3,3 DAB (diaminobenzidine).

b) <u>Protocole de marquage</u> « sur coupes en paraffine »

On déparaffine les coupes soigneusement dans le toluène neuf pendant 10 à 15 min. Ensuite on déshydrate dans de l'alcool absolu (5 min).On rince à l'eau courante pendant 2 min. On procède à l'immersion des lames dans de l'H2O2 et on rince à l'eau courante. On met les coupes dans le tampon citrate en ébullition dans un bain marie à 97°C pendant 40 min. Par la suite on procède à un refroidissement du tampon citrate pendant 20 min. On lave les lames à l'eau pendant 2 min. On transfère les coupes dans le tampon Tris pendant 2 min. Les lames sont disposés à plat en chambre humide et recouverte de sérum normal de chèvre dilué au 1/5ème pendant 10 min. On recouvre chaque coupe avec l'anticorps primaire spécifique de la β endorphine, dilué au 1/500ème pendant 30 min. On lave au tampon Tris pendant 5 min. Ensuite, on recouvre les lames du complexe streptavidine-biotine-peroxydase dilué au 1/500ème dans du tampon Tris. Les lames sont recouvertes par du substrat chromogène (DAB) pendant 10 à 15 min. On colore légèrement les noyaux à l'hématoxyline de Harris pendant 1 min. On fait bleuir les coupes quelques secondes dans l'alcool amoniacal à 3 %. On procède aussi à la déshydratation dans des alcools successifs à 95°et 100. Enfin on immerge dans du toluène et on colle les lamelles et on laisse sécher sur la platine.

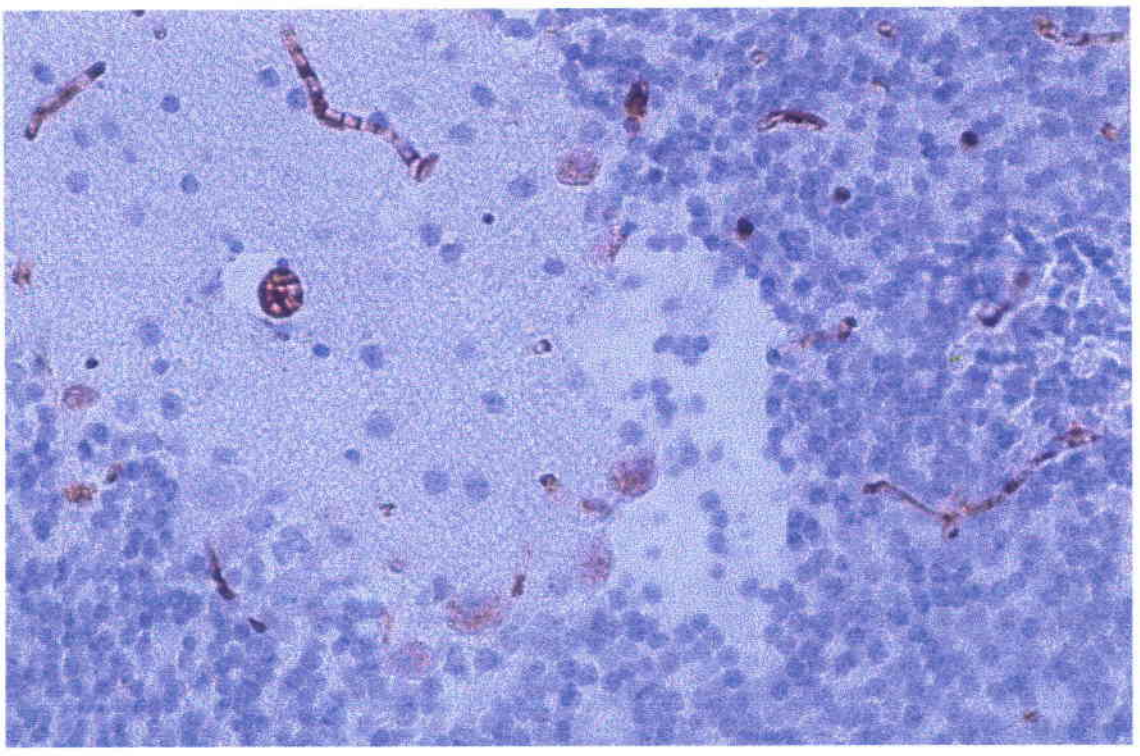


(x 10)

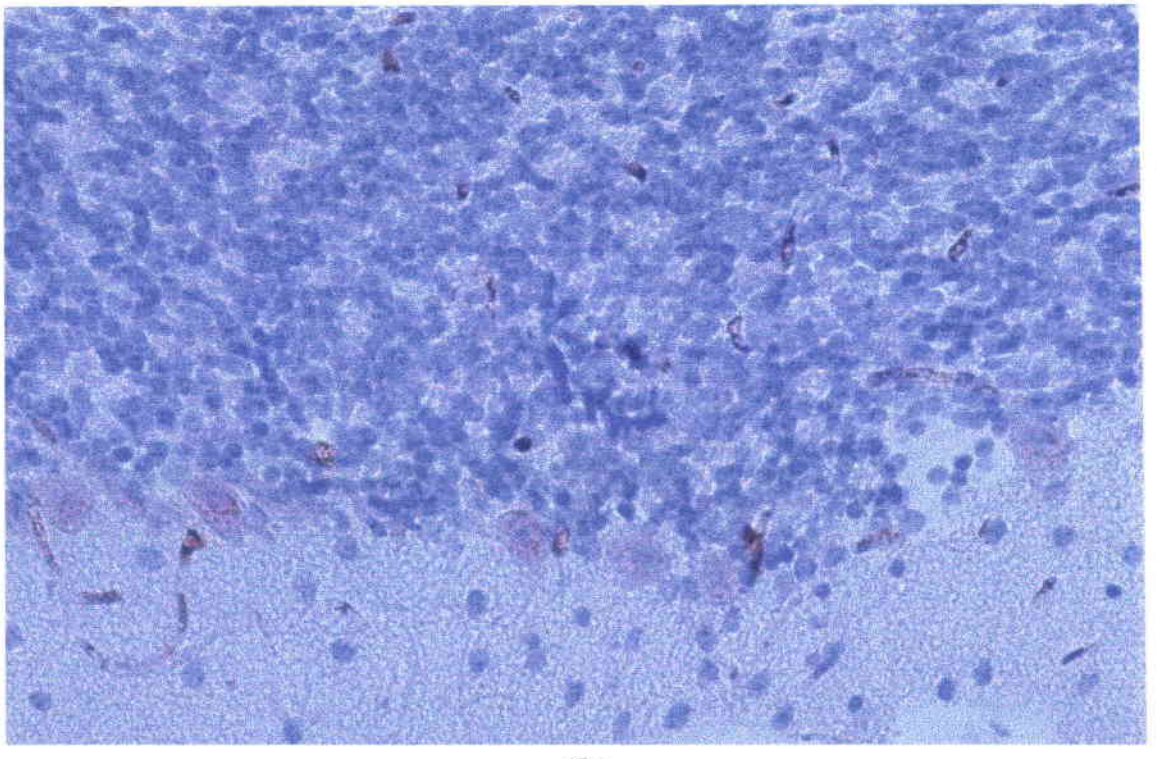


(x 40)

Fig.1. Expression de la β endorphine dans l'antéhypohyse des souris non stressées (Marquage Streptadine-Peroxydase). Marquage positif: localisation de l'hormone au niveau des vaisseaux.



(a)



(b)

Fig.2. Expression de la β endorphine au niveau de l'antéhypophyse des souris exposées au stress physique et psychosocial (x 40). **(a):** Antéhypophyse des souris exposées au stress physique, la localisation de la β endorphine est au niveau des cellules productrices et au niveau des vaisseaux. **(b)**: Antéhypophyse des souris exposées au stress psychosocial, la même intensité de marquage, et la même localisation de l'hormone (les cellules productrices et les vaisseaux).

I) Détermination du nombre des leucocytes, celui des lymphocytes T CD4, TCD8 et celui des cellules NK à différents intervalles séparant le stress du dosage 0h (Immédiatement), 24h et 48 après (Voir Fig.1a,2a,3a et Tab.3a et 3b).

II) Détermination du nombre des leucocytes, celui des lymphocytes T CD4, TCD8 et celui des cellules NK à différentes durées des deux types de stress appliqués: (Voir Fig. 1b,2b,3b; Fig. 1c,2c,3c ; Tab. 1a, 1b et 2a , 2b).

- **Stress physique (25min, 50min et 75 min).**
- **Stress psychosocial (1h, 2h et 4h).**

III) Dosage de la corticostérone à différentes durées des deux types de stress appliqués: (Voir Fig. 1d,2d).

IV) Dosage de la corticostérone à différents intervalles séparant le stress du dosage (Voir Fig. 3d)

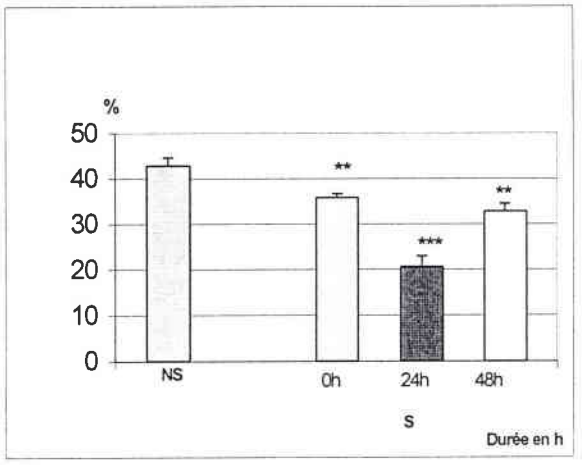


Fig. 1a. Effet de l'intervalle séparant le stress du dosage sur le nombre des lymphocytes TCD4 chez la souris
N=9x4 lots. ***: P<0.001, **: P<0.01.

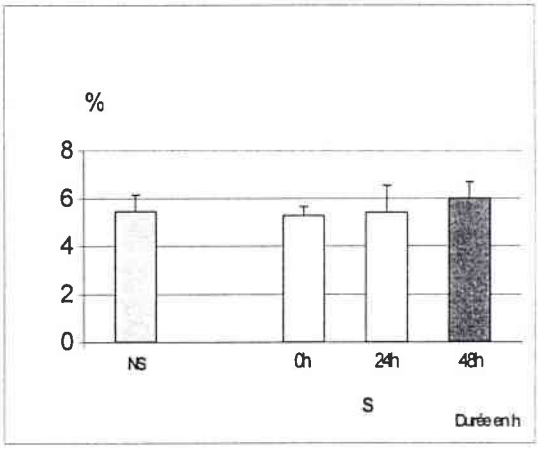


Fig. 2a. Effet de l'intervalle séparant le stress du dosage sur le nombre des lymphocytes TCD8 chez la souris.
N=9x4 lots.

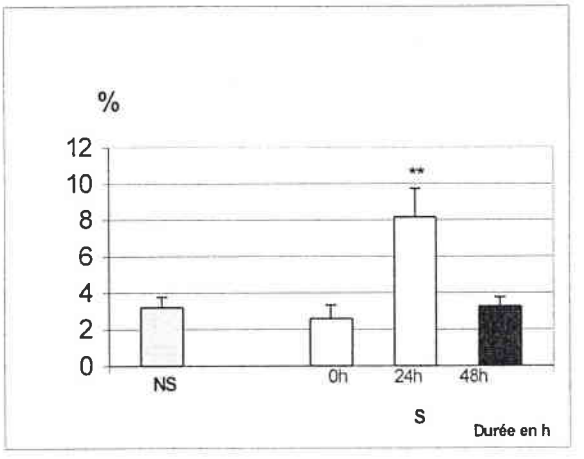


Fig. 3a. Effet de l'intervalle séparant le stress du dosage sur le nombre
Des cellules tueuses NK chez la souris. N=9x4 lots. ** : P< 0.01.

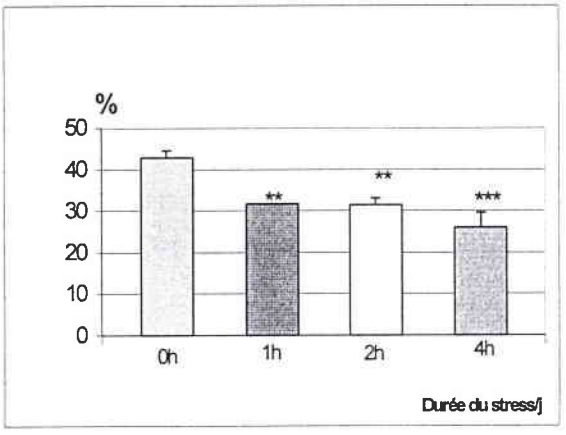


Fig. 1b. Effet des différentes durées de stress psychosocial sur le nombre nombre des lymphocytes TCD4 chez la souris
N=9x4 lots.***: P<0.001, **: P<0.01.

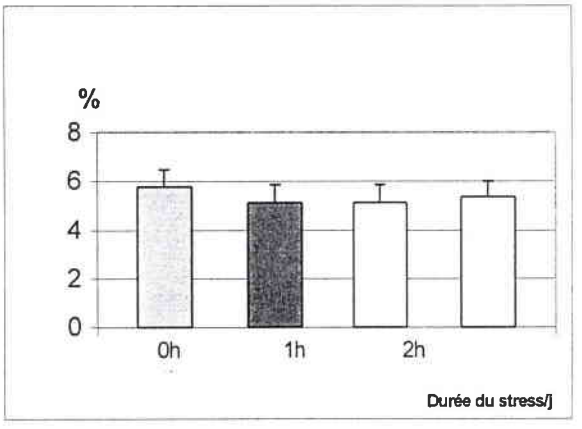


Fig. 2b. Effet des différentes durées de stress psychosocial sur le nombre des lymphocytes TCD8 chez la souris.
N=9x4 lots.

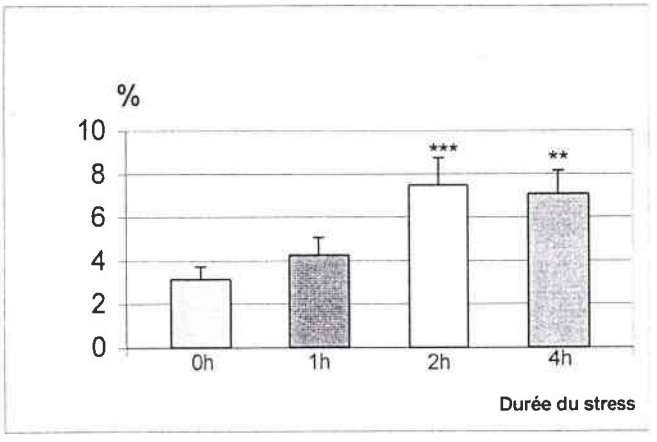


Fig. 3b.Effet des différentes durées de stress psychosocial sur le nombre des cellules tueuses naturelles NK chez la souris.
N=9x4 lots. ***: P< 0.001; **: P<0.01.

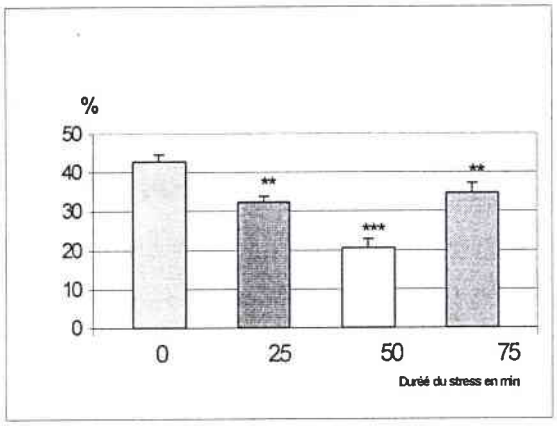


Fig.1c. Effet des différentes durées de stress physique sur le nombre des lymphocytes T CD4 chez la souris. N=9x4 lots. ***: P<0.001, **: P<0.01.

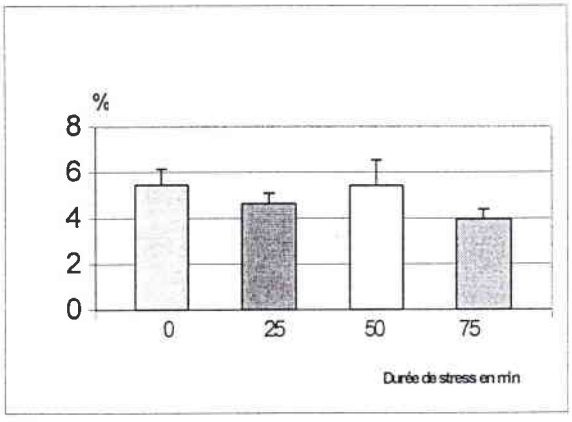


Fig.2c. Effet des différentes durées de stress physique sur le nombre des lymphocytes T CD8 chez la souris. N=9x4 lots.

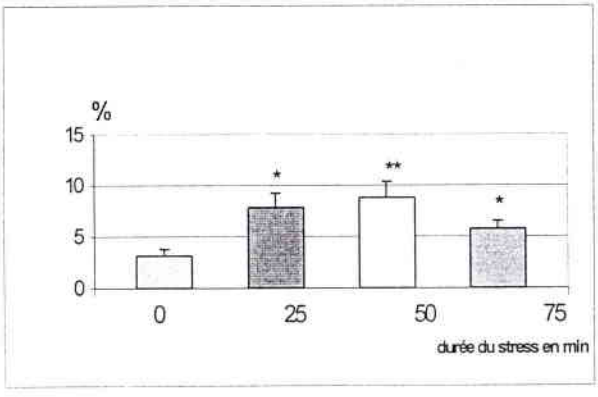


Fig. 3c. Effet des différentes durées de stress psychosocial sur le nombre des cellules tueuses NK. N= 9x4 lots. ** : P< 0.01 ; * : P< 0.05.

Tableau. 1a Effet des différentes durées du stress physique sur le nombre des leucocytes chez la souris. N=9x4 lots. P<0.05 est considéré significatif.

Nombre des cellules $10^3/\mu l$	INS	IS		
		25 min (150 chocs)	50 min (300 chocs)	75 min (450 chocs)
Lym	3.824 ± 0.296 ///	3.541 ± 0.457 P=0.600	1.730 ± 0.231 P=0.007	4.403 ± 0.480 P=0.210
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,29)= 10.620 ; P=0.0001			
Neut	1.875 ± 0.407 ///	1.520 ± 0.192 P=0.600	0.911 ± 0.0.091 P=0.007	5.021 ± 0.920 P=0.210
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,25)= 10.333 ; P= 0.0001			
Bas	0.283 ± 0.062 ///	0.014 ± 0.014 P=0.001	0.097 ± 0.028 P=0.001	0.014 ± 0.014 P=0.001
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,24)=10.863 ; P=0.0001			
Mon	2.340 ± 0.231 ///	2.320 ± 0.231 P=0.540	1.950 ± 0.121 P=0.023	1.922 ± 0.224 P=0.100
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,24)=3.443 ; P= 0.032			
Eos	0.003 ± 0.003 ///	0.064 ± 0.028 P=0.012	1.052 ± 0.172 P=0.0001	0.050 ± 0.023 P=0.680
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,23)= 26.921 ; P= 0.0001			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
Lym : lymphocytes ; Neut : neutrophiles ; Bas : basophiles ; Mon : monocytes ; Eos : éosinophiles.

Tableau. 1b Effet des différentes durées de stress physique sur les paramètres sanguins chez la souris. N= 9x4 lots. P<0.05 est considéré significatif.

	INS	IS		
		25 min (150 chocs)	50 min (300 chocs)	75 min (450 chocs)
RBC $10^6/\mu l$				
Moy	8.460	8.077	7.263	8.473
±	±	±	±	±
SEM	0.191	0.226	0.505	0.403
P	///	P=0.985	P=0.120	P=0.447
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(2,13)= 0.483 ; P= 0.627			
VCM fl				
Moy	51.200	50.200	48.567	49.333
±	±	±	±	±
SEM	0.785	0.245	0.650	0.367
P	///	P=0.614	P=0.020	P=0.223
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(2,13)= 2.345 ; P= 0.135			
HCT %				
Moy	43.360	37.550	35.417	37.083
±	±	±	±	±
SEM	1.086	1.888	2.695	1.134
P	///	P=0.167	P=0.030	P=0.119
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(2,13)= 3.436 ; P= 0.063.			
Plqts 103/µl				
Moy	483.500	254.167	646.167	562.875
±	±	±	±	±
SEM	108.391	73.194	28.866	63.377
P	///	P=0.060	P=0.170	P=0.310
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(2,13)= 5.434 ; P= 0.019.			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen; HCT : hématocrite ; Plqt : les plaquettes.

Tableau. 2a Effet des différentes durées de stress psychosocial sur le nombre des leucocytes chez la souris. N=9x 4 lots. P< 0.05 est considéré significatif.

Nombre des cellules $10^3/\mu l$	INS	IS 1h	IS 2h	IS 4h
Lym	3.824 ± 0.296 ///	3.617 ± 0.468 P=0.888	4.300 ± 0.573 P=0.255	1.864 ± 0.222 P=0.0006
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,26)= 9.195 ; P= 0.0003.			
Neut	1.875 ± 0.407 ///	4.940 ± 1.617 P=0.003	2.067 ± 0.648 P=0.816	1.767 ± 0.209 P=0.990
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,20)= 3.207 ; P= 0.045.			
Bas	0.283 ± 0.062 ///	0.020 ± 0.020 P=0.083	0.017 ± 0.017 P=0.06	0.000 ± 0.000 P=0.030
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,20)= 14.814 ; P=0.0001.			
Mon	2.340 ± 0.231 ///	1.180 ± 0.222 P=0.075	1.750 ± 0.296 P=0.431	1.150 ± 0.167 P=0.039
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,19)= 3.002 ; P= 0.056.			
Eos	0.003 ± 0.003 ///	0.06 ± 0.024 P=0.338	0.100 ± 0.063 P=0.092	0.100 ± 0.046 P=0.070
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,19)= 1.575 ; P= 0.228.			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
Lym : lymphocytes ; Neut : neutrophiles ; Bas : basophiles ; Mon : monocytes ; Eos : éosinophiles.

Tableau. 2b. Effet des différentes durées de stress psychosocial sur les paramètres sanguins chez la souris. N=9x4 lots. P< 0.05 est considérée significatif.

	INS	IS		
		1h	2h	4h
RBC 10^6/µl				
Moy	8.460	7.238	6.267	8.906
±	±	±	±	±
SEM	0.191	0.161	0.405	0.206
P	///	P=0.002	P=0.0001	P=0.214
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,16)= 13.261 ; P= 0.0001.			
VCM fl				
Moy	51.200	49.450	46.486	49.725
±	±	±	±	±
SEM	0.785	0.626	2.908	0.920
P	///	P=0.434	P=0.03	P=0.483
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,16)= 0.773 ; P= 0.526.			
HCT %				
Moy	43.360	35.850	33.814	43.450
±	±	±	±	±
SEM	1.086	1.055	3.329	1.463
P	///	P=0.010	P=0.013	P=0.395
One Way Anova	**Effet des différentes types de stress** F(3,13)= 4.179 ; P= 0.028.			
Plqts 103/µl				
Moy	483.500	394.200	334.500	609.333
±	±	±	±	±
SEM	108.391	109.724	63.525	70.817
P	P=0.441	P=0.905	P=0.520	P=0.050
One Way Anova	**Effet des différentes durées de stress** F(3,10)= 1.881; P= 0.196.			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen; HCT : hématocrite ; Plqt : les plaquettes.

Tableau. 3a Effet de l'intervalle séparant le stress du dosage sur les paramètres sanguins chez la souris. N=9x4 lots. P< 0.05 est considéré significatif.

	INS	IS		
		0h après	24 après	48 h après
RBC $10^6/\mu l$				
Moy	8.460	7.839	7.263	8.115
±	±	±	±	±
SEM	0.191	0.264	0.505	0.160
P	///	P=0.138	P=0.120	P=0.315
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice.** F(2,15)= 1.735; P= 0.218			
VCM fl				
Moy	51.200	49.771	48.567	50.650
±	±	±	±	±
SEM	0.785	0.579	0.650	0.851
P	///	P=0.341	P=0.020	P=0.812
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice.**. F(2, 15)= 0.459; P= 0.643			
HCT %				
Moy	43.360	33.781	35.417	41.150
±	±	±	±	±
SEM	1.086	4.245	2.695	0.409
P	///	P=0.040	P=0.030	P=0.753
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice.** F(2, 15)= 1.768; P= 0.215			
Plqts 103/µl				
Moy	483.500	617.430	646.167	642.839
±	±	±	±	±
SEM	108.391	23.912	28.866	98.483
P	P=0.441	P=0.200	P=0.170	P= 0.03
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice.** F(2, 22)= 2.200 ; P= 0.116			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.
RBC :.les globules rouges ; VCM : volume globulaire moyen; HCT : hématocrite ; Plqt : les plaquettes

Tableau. 3b. Effet de l'intervalle séparant le stress du dosage sur le nombre des leucocytes chez la souris. N=9x4 lots. P< 0.05 est considéré significatif.

Nombre des cellules $10^3/\mu l$	INS	IS		
		0h après	24 après	48 h après
Lymphocytes	3.824 ± 0.296 ///	4.600 ± 0.310 P= 0.02	1.730 ± 0.213 P= 0.007	5.250 ± 0.598 P= 0.005
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice** F(2,28)= 5.120 ; P= 0.010			
Neutrophiles	1.875 ± 0.407 ///	1.570 ± 0.303 P=0.200	0.901 ± 0.281 P=0.019	2.025 ± 0.478 P= 0.959
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice** F(2.20)= 1.554 ; P= 0.243			
Basophiles	0.283 ± 0.062 ///	0.057 ± 0.057 P=0.003	0.023 ± 0.021 P=0.001	0.150 ± 0.119 P= 0.238
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice** F(2, 20)= 2.985 ; P= 0.081			
Monocytes	2.340 ± 0.231 ///	1.157 ± 0.303 P= 0.001	1.950 ± 1.121 P= 0.023	0.975 ± 0.236 P= 0.004
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice.** F(2, 17)= 10.955 ; P= 0.0014			
Eosinophiles	0.003 ± 0.003 ///	0.014 ± 0.014 P=0.323	1.052 ± 0.172 P=0.0001	0.025 ± 0.023 P= 0.343
One Way Anova	**Effet de l'intervalle entre le stress et le sacrifice** F(2, 17)= 0.490 ; P= 0.622			

INS : Immunisés non stressés.
IS : Immunisés stressés.

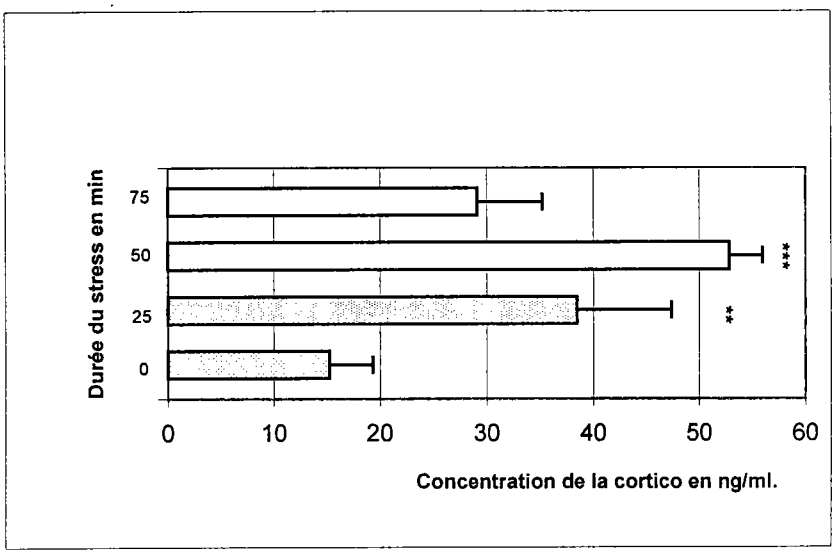


Fig.1d. Effet des différentes durées de stress physique sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x 4 lots. ***:P< 0.001,**:P<0.01.

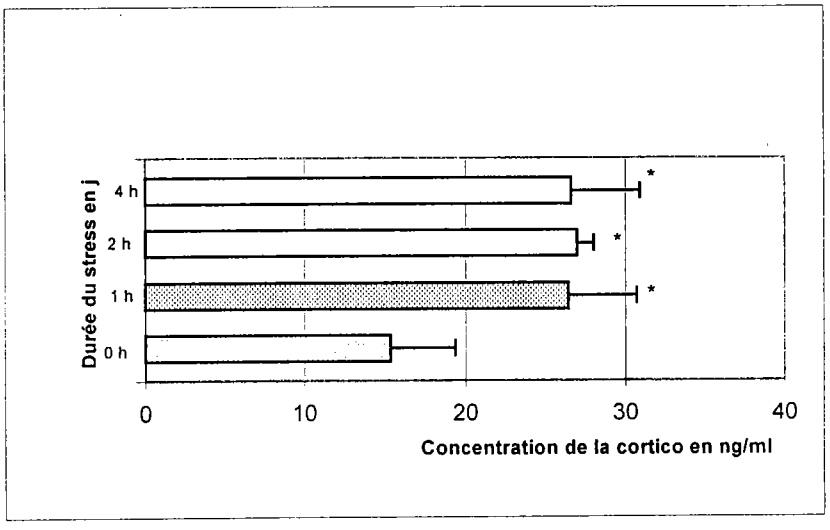


Fig. 2d. Effet des différentes durées de stress psychosocial sur la concentration plasmatique de la corticostérone chez la souris. N=5x4 lots. *: P<0.05.

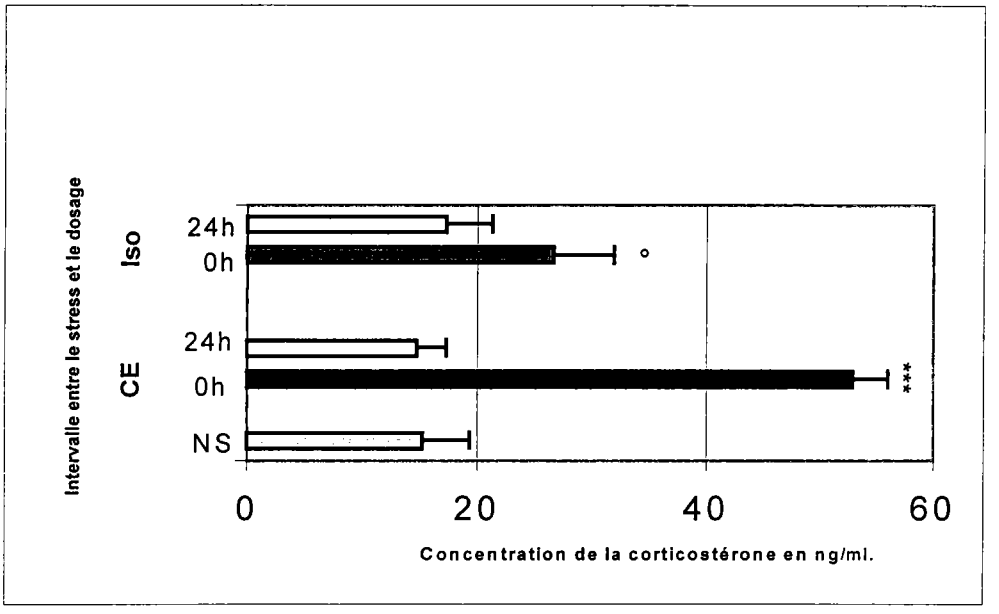


Fig. 3d. Effet du stress (physique et psychosocial) sur la concentration plasmatique de la corticostérone. le dosage a été fait immédiatement (0h) et 24h après le stress. CE: chocs électriques, Iso: isolement social. NS:non stressés. N=5x4 lots. ***: P<0.001; °: P< 0.05.

ABSTRACT

The main objective of our study was to investigate the importance interval separating the immunization of the application of stress in disturbances on immune, behavioral and gastric functions of mice. Our results showed that hormonal immunity was increased after the application of stress, however, the cellular immunity was considerably decreased in the stressed animals. The stress showed tendency to decrease the locomotor and explorator activity of animals in two used tests: light /dark box test and the staircase test. The results also indicated that the stress significantly increased the gastric mucous lesions.
In order to extend our research we have conducted a comparative and experimental study using two models of stress, social and physical stress. These experiments provide some examples of disturbances generated by these two models of stress. The two models were applied at short and long term on general behavior, cellular immunity, gastric and hormonal responses. Our results showed that the two types of stress have tendency to decrease the number of TCD4 and to increase the circulating cells NK. On the other hand, these disturbances didn't affect the number of T CD8 cells. Concerning the gastric response, our results showed that the inflammation of the gastric mucous is more important in animals exposed to the physical stress in comparison with the isolated animals. Concerning the behavior, we noted that the explorer activity decreased after the application of the two stress models.

The dosage of plasma catecholamines was determined using HPLC and the plasmatic corticosterone level was detected by RIA technique. We noted that the applied physical stress considerably increased the rate of the corticosterone and also of one of the catécholamines (adrenaline and noradrénaline) compared with those animals exposed to the social stress.

In our study we were also interested in investigating the role and the implication of opioïdergic and benzodiazépiniques systems on the different immunities disturbances generated by stress. Our results put more emphasis on the implication of opioids and benzodiazepines receptors on the immunosuppressor effect of the experimental stress in mice.

In the second part of the work, we studied the pharmacological properties of the different plants and animal compounds such as *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L., *Poumon histamine* and *Histaminium* to induce behavioral, immune and gastric responses. The results showed that *A. belladonna L.* has a pharmacological profile of anxiolytic type to 9 CH, whereas *G. sempervirens* L. possesses immunoprotective and gastroprotective properties, particularly to doses 5 CH and 15 CH. These effects are probably associated with their neurotropic, anxiolytic-like effects. *P. histamine* resulted in a pharmacological active effect on immune system in all tested doses. These effects of *P. histamine* are probably associated with its pharmacological properties on immune system with a secondary effect of neurotropic type. In the second step, we studied the pharmacological properties of *G. sempervirens* L., *P. histamine* and *Histaminium* on stress induced alterations in TCD4, TCD8 and NK cells. The results showed that only 9 CH of all three products, reversed stress-induced response of NK cells.

Key words: **Stress, Immunity, Behaviour, Mucous Gastric, Corticosterone, Catecholamines, Opioids, Benzodiazépines.**

RÉSUMÉ

Dans une étude préliminaire, nous avons montré l'importance de l'intervalle séparant l'immunisation de l'application du stress dans les perturbations des fonctions immunitaire, comportementale et gastrique chez la souris. Nos résultats ont montré que l'immunité humorale augmente après l'application du stress, alors que l'immunité cellulaire diminue considérablement chez les animaux stressés. Sur le plan comportemental, le stress a tendance à diminuer l'activité locomotrice et exploratoire des animaux dans les deux tests utilisés (test de la chambre claire/obscure et le test de l'escalier). Nos résultats ont montré aussi que le stress augmente de façon importante les lésions de la muqueuse gastrique chez la souris.

Dans le but d'approfondir ce travail, nous avons entrepris une étude expérimentale comparative utilisant deux modèles de stress (stress social et physique). Cette étude fournit quelques exemples des perturbations engendrées par ces deux modèles de stress appliqué à court terme et à long terme sur le comportement général, l'immunité cellulaire et sur les réponses gastriques et endocriniennes. Nos résultats ont montré que les deux types de stress ont tendance à diminuer le nombre des lymphocytes auxiliaires TCD4 et à augmenter celui des cellules NK circulants. Par ailleurs, ces perturbations ne concernent pas les cellules T CD8 chez les animaux exposés aux deux types de stress. Concernant, la réponse gastrique, nos résultats ont montré que l'inflammation de la muqueuse gastrique est beaucoup plus importante chez les animaux exposés au stress physique comparé aux animaux isolés. Concernant le comportement, nous avons noté que l'activité exploratoire, diminue après l'application des deux modèles de stress étudiés.

Le dosage des catécholamines plasmatiques a été réalisé par HPLC alors que celui de la corticostérone plasmatique a été plutôt évalué par la technique RIA. Nous avons constaté ainsi que le stress physique augmente considérablement le taux de la corticostérone et celui des catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par rapport aux animaux exposés au stress social.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'étude du rôle et de l'implication des systèmes opioïdergiques et benzodiazépiniques dans les différentes perturbations immunitaires engendrées par le stress. Ces résultats mettent l'accent sur l'implication des récepteurs opioïdes et benzodiazépiniques dans les effets immunosuppresseurs engendrés par le stress expérimental chez la souris.

Dans cette deuxième partie du travail et dans un premier temps, nous avons étudié les propriétés pharmacologiques de différents produits d'origine animale et végétale tels que : *Atropa belladonna* L., *Gelsemium sempervirens* L., *Poumon histamine* vis à vis des réponses comportementales, immunitaires et gastriques induites par le stress expérimental. Les résultats ont montré que *A. belladonna* aurait plutôt un profil pharmacologique de type anxiolytique à 9 CH, *G. sempervirens* posséderait plutôt des propriétés immunoprotectrices et gastroprotectrices, particulièrement aux doses 5 CH et 15 CH. Ces effets sont associés probablement à leur profil neurotropique, anxiolytique-like. Cependant *P. histamine* a montré un effet pharmacologique plutôt actif sur le système immunitaire à toutes les doses. Ces effets de *P. histamine* sont probablement associés à sa principale activité pharmacologique sur le système immunitaire, avec un effet secondaire de type neurotropique. Dans un deuxième temps, nous avons étudié les propriétés pharmacologiques de *G. sempervirens* , du *P. histamine* et de l'*Histaminium* vis à vis des altérations de l'immunité cellulaire (TCD4, TCD8 et NK), induites par le stress expérimental. Nos résultats ont montré que la dose 9 CH des trois produits, s'oppose aux effets immunosuppresseurs du stress uniquement vis à vis de la régulation de la réponse des cellules NK.

Mots clés: ***Stress, Immunité, Comportement, Muqueuse Gastrique, Corticostérone, Catécholamines, Opioïdes , Benzodiazépines, Souris.***