



**HAL**  
open science

## Effets centraux de la pyridostigmine administrée en situation de stress

Laure Barbier

► **To cite this version:**

Laure Barbier. Effets centraux de la pyridostigmine administrée en situation de stress. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00385096

**HAL Id: tel-00385096**

**<https://theses.hal.science/tel-00385096>**

Submitted on 18 May 2009

**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.

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER- GRENOBLE**

Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Joseph Fourier, Grenoble

Discipline : Ingénierie de la cognition, de l'interaction, de l'apprentissage et de la création

Présentée et soutenue publiquement par

Laure BARBIER

le 19 Mars 2009

**Effets centraux de la pyridostigmine administrée en situation de stress**

Directeur de thèse

Dr. Christine Amourette

**Jury :**

Pr. Claude Feuerstein, GIN, Université Joseph Fourier, Grenoble	Président
Dr. Daniel Beracochea, Université Bordeaux	Rapporteur
Dr. Luc Denoroy, Université Lyon I- Claude Bernard	Rapporteur
Pr. Claude Renaudeau, Ecole du Val de Grâce	Examineur
Dr. Laurent Bezin, CNRS, Université Lyon I- Claude Bernard	Examineur
Dr. Christine Amourette, CRSSA Emile Pardé, La Tronche	Directeur de thèse



## Remerciements

Je tiens ici à adresser mes remerciements aux différentes personnes qui, de près ou de loin, ont participé, collaboré, encouragé, conseillé ou dirigé le présent travail.

Je remercie tout d'abord l'ensemble des membres du jury :

Messieurs les Dr Denoroy et Beracochea pour avoir accepté d'être rapporteurs et de juger ce travail.

Messieurs les Professeurs Feuerstein et Renaudeau et le Docteur Bezin d'avoir évalué cette thèse en participant au jury en tant qu'examineurs.

Madame le Pharmacien en chef et Docteur Christine Amourette qui m'a accueillie au sein de son équipe pendant ces trois années, trop vite passées. Merci pour votre disponibilité et la confiance que vous m'avez accordée. Je tiens ici à vous exprimer toute ma gratitude et vous dire à quel point j'ai eu plaisir à travailler avec vous. Merci pour vos encouragements permanents, votre gentillesse, votre grande humanité, pour m'avoir soutenue et conseillée dans des moments particulièrement difficiles.

J'adresse également mes remerciements les plus sincères à tous ceux qui m'ont offert les moyens matériels, humains et intellectuels pour réaliser ce travail :

A monsieur le Dr William Fauquette, pour ta disponibilité, ton esprit de synthèse, tes conseils toujours judicieux, ta rigueur scientifique et ton soutien. Trouve ici un modeste témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

A monsieur le Dr Michel Diserbo, je te remercie pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes précieux conseils informatiques et statistiques.

Je tiens également à exprimer toute ma gratitude au Dr André Peinnequin pour avoir participé à nos réflexions scientifiques constructives tout au long de ce travail de thèse et pour ton soutien dans les moments difficiles. André, je te remercie de m'avoir littéralement « portée » pendant 6 mois de mises au point infructueuses. Merci pour ton enthousiasme, ta persévérance, tes grandes qualités scientifiques et surtout humaines. Je te remercie également pour ta pédagogie, la confiance que tu as eu en moi et tes encouragements permanents.

Ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé sans le soutien de différentes personnes que je tiens à remercier :

Merci à Pascal et Thomas qui m'ont aidée à traverser des épreuves difficiles avec bonne humeur. Merci de votre soutien quotidien et de vos conseils toujours judicieux. Je souhaite vous exprimer ici la joie que j'ai eu à vous côtoyer durant ces deux années tant pour vos

qualités scientifiques, votre gentillesse, votre écoute et nos petites discussions sur des sujets divers et variés... Je tiens également à remercier tout particulièrement Fanny pour ses corrections assidues même en période de Noël !!

Merci à Laurence, dite Lolotte, pour ton soutien dans des épreuves parfois difficiles, pour ta bonne humeur quotidienne et pour ton amitié...

Merci à Michelle, secrétaire de choc... pour vos cannelés, petits chocolats et clémentines... et surtout pour nos « tea time » me permettant de souffler quelques instants durant les longs mois de rédaction.

Merci aux étudiants que j'ai eu la chance de rencontrer au cours de ces 3 années. Merci à Amélie et Audrey pour leur bel enseignement des techniques d'immunomarquages et des coupes cérébrales. Je tiens également à remercier Nicolas pour sa joie de vivre au quotidien, ses délicates attentions, ses paroles toujours réconfortantes. Trois personnes aux qualités exceptionnelles. Je leur souhaite beaucoup de bonheur dans leur vie personnelle et de poursuivre dans les voies qu'ils se sont choisies.

Merci à l'ensemble du personnel du « bâtiment 18 » pour leur gentillesse et l'ambiance chaleureuse qu'ils y font régner...

Un grand merci à David, qui m'a soutenue et supportée avec un calme olympien. Merci de ta patience et de l'attention que tu as eu envers moi ces derniers mois.

Merci à Maryline pour ton soutien quotidien et sans limites, pour ton amitié malgré les 700 kms qui nous séparent...

Merci à ma maman, à ma sœur et à mon frère qui m'ont toujours épaulée. J'en profite pour m'excuser de ne pas avoir été présente « physiquement » pendant un an...

Enfin, Papa, je te dédie cette thèse, toi qui a encouragé ma curiosité et m'a toujours soutenue dans chacun des choix que j'ai eu à faire, tant personnel que professionnel... Merci pour chacun des mots échangés, pour tes conseils et ta philosophie de la vie...



### **Résumé :**

La réalité du « Syndrome de la guerre du Golfe » longtemps controversée vient récemment d'être affirmée par un rapport établi à la demande du Congrès américain. Ce même rapport met plus particulièrement en cause l'utilisation, par les soldats, d'anticholinestérasiques tels que des insecticides, des pesticides et la pyridostigmine (PB), traitement prophylactique des intoxications aux neurotoxiques organophosphorés.

Dans ce travail, nous avons utilisé un modèle rongeur afin de rechercher si la PB, administrée en situation de stress, peut engendrer des atteintes cérébrales au niveau cellulaire, moléculaire ou fonctionnel. Alors que le traitement ou le stress seuls ne se traduisent par aucun effet sur les capacités d'apprentissage des animaux, les rats stressés ayant reçu la PB présentent un retard d'apprentissage. Pourtant, chez ces animaux, nous avons mis en évidence, dans l'hippocampe, une augmentation de l'expression de gènes en faveur de l'amélioration des processus cognitifs. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par le fait que le traitement par la PB modifie la réponse au stress des animaux, comme le suggère l'augmentation de l'expression des récepteurs aux minéralocorticoïdes que nous avons observée dans l'hypothalamus.

Bien que cette étude expérimentale mette en évidence que la PB administrée en situation de stress peut présenter des effets secondaires, au niveau cérébral, elle ne peut, à l'heure actuelle, remettre en cause l'utilisation de ce traitement prophylactique en cas de menace chimique, particulièrement en cas de risque d'intoxication au soman.

### **Abstract :**

Reality of « Gulf war syndrome » has been much discussed. However, a recent report presented at the American Congress confirmed its existence. This report rises questions particularly about the use of anticholinesterasics by soldiers, such as insecticides, pesticides and pyridostigmine bromide (PB), a drug used as a prophylaxis treatment against nerve agent poisoning.

In this work we evaluated, in a rat model, cellular, molecular and behavioral consequences of the association of repeated stress and PB treatment. While stress or PB alone have no effect on learning abilities, association of stress and PB treatment leads to learning dysfunctions. However, stressed rats receiving PB present an increase in the hippocampus expression of genes implicated in learning development. This paradox might be explained by PB treatment which modifies stress response of animals. Indeed, we have shown that PB increases mineralocorticoids receptor expression in hypothalamus.

Although this study demonstrates that administration of PB, under stress, can induce central side effects, PB use for prophylaxis treatment has not to be reconsidered because of its vital requirement essentially in case of soman intoxication.



## Liste des abréviations

Acétyl coA	Acétyl coenzyme A
ACh	Acétylcholine
AChE	Acétylcholinestérase
ACtCh	Acétylthiocholine
ACTH	Adrenocorticotropin hormone (hormone adréno-corticotrope)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AIF	Apoptosis-inducing factor (facteur induisant l'apoptose)
AMM	Autorisation de mise sur le marché
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
Apaf-1	Apoptotic protease-activating factor-1
ARBP	Acidic ribosomal phosphoprotein
ARE	Adenine/uridine-rich element (séquence riche en adénine/uridine)
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVP	Arginine vasopressine
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BrdU	Bromodéoxyuridine
BuChE	Butyrylcholinestérase
CaM	Calmoduline
CamKII	Calcium-calmoduline kinase II
CBG	Corticostéroïd-binding-protein (transcortine)
ChE	Cholinestérase
CIAC	Convention d'interdiction d'utilisation des armes chimiques
CREB	cAMP response element binding protein (élément de réponse liant l'AMPc)
COX-2	Cyclo-oxygenase 2
CRF	Corticotropin releasing factor (corticolibérine)
CV	Coefficient de variation
CycA	Cyclophilin A
DAB	3, 3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride
DAG	Diacylglycérol
DEET	N,N-diéthyl-m-toluamide
DL50	Dose létale 50 %
DTNB	Acide dithio-5,5'-bis-(nitro-2 benzoïque)

GABA	Acide- $\gamma$ -aminobutyrique
GDP	Guanosine di-phosphate
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (protéine acide fibrillaire gliale)
GR	Glucocorticoid receptor (récepteur aux glucocorticoïdes)
GRE	Glucocorticoid response element (élément de réponse aux glucocorticoïdes)
GTP	Guanosine tri-phosphate
3-HMP	3-hydroxy-N-méthyl-pyridinium
HPA	Hypothalamo-pituitary-adrenal (axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien)
Hpc	Hippocampe
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
HPRT	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
11 $\beta$ HSD	11- $\beta$ hydroxystéroïde déshydrogénase
HSE	Heat shock element (promoteur du gène codant pour les Hsp)
HSF	Heat shock factor
Hsp	Heat shock proteins (protéines de choc thermique)
HY	Hypothalamus
IC	Intervalle de confiance
IEG	Immediate early gene (gène rapidement inducible)
IgG	Immunoglobulines G
I- $\kappa$ B	Inhibiteur de NF- $\kappa$ B
Il	Interleukine
Il-1	Interleukine-1
Il-1ra	Interleukine-1 receptor antagonist (antagoniste du récepteur de l'Il-1)
Il-1R1	Interleukin-1 receptor (récepteur de l'Il-1)
iNOS	inducible nitric oxide synthase (monoxyde d'azote synthase inducible)
<i>i.m.</i>	Intra-musculaire
<i>i.v.</i>	Intra-veineux
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphate
iso-OMPA	Tetraisopropyl pyrophosphoramide
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
LTh	Lymphocyte T helper
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCIP1	Modulatory-calcineurin-interacting protein
MR	Mineralocorticoid receptor (récepteur aux minéralocorticoïdes)
MSH	Hormone mélanostimulante
NCAM	Neural cell adhesion molecule (molécule d'adhérence neuronale)

NF-κB	Nuclear Factor kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
nGRE	negative GRE (élément de réponse négatif aux glucocorticoïdes)
NK	test de Newman-Keuls
NLS	Nuclear localisation sequence (séquence de localisation nucléaire)
NMDA	Récepteur au N-méthyl-D-aspartate
NOP	Neurotoxique organophosphoré
NTE	Neuropathy-target-esterase
Oligo(dT)	Oligodéoxythymidine
ONU	Organisation des Nations Unies
2-PAM	2-pyridine aldoxime methyl chloride
PB	Bromure de pyridostigmine ou pyridostigmine
PCA	Test du Pole Climbing Avoidance
PCR	Polymerase chain reaction (réactions de polymérisation en chaîne)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphates
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLC	Phospholipase C
<i>p.o.</i>	<i>per os</i> , par voie orale
POMC	Pro-opiomélanocortine
PON	Paraoxonase
PVN	Noyau hypothalamique paraventriculaire
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RER	Réticulum endoplasmique rugueux
RIA	Dosage radioimmunologique
RT	Transcription inverse
RT-PCR	Transcription inverse suivie de réactions de polymérisation en chaîne
<i>s.c.</i>	Sous-cutanée
SEM	Standard error mean
SGA	Syndrome général d'adaptation
SGZ	Zone subgranulaire de l'hippocampe
SLA	Sclérose Amyotrophique Latérale
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SON	Noyau supra-optique de l'hypothalamus
SVZ	Zone subventriculaire du striatum
TBS	Tris Buffer Saline (Tampon Tris salin)

TLR	Toll-like receptors
T <sub>m</sub>	Température de fusion
TNB	acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$ (facteur de nécrose tumorale $\alpha$ )
TrkB	Tropomyosin related kinase
TUNEL	TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) mediated dUTP-biotin Nick End Labelling
UA	Unités arbitraires
VACht	Vesicular-acetylcholin-transporter (transporteur vésiculaire de l'acétylcholine)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (facteur de croissance endothélial vasculaire)

# TABLE DES MATIERES

Remerciements

Liste des abréviations

## INTRODUCTION GENERALE

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>CHAPITRE I : LE SYNDROME DE LA GUERRE DU GOLFE.....</b>	<b>3</b>
<b>1) LE CONFLIT DE LA GUERRE DU GOLFE.....</b>	<b>4</b>
1.1- L'OFFENSIVE MILITAIRE .....	4
1.2- L'ENVIRONNEMENT .....	4
<b>2) LE SYNDROME DE LA GUERRE DU GOLFE.....</b>	<b>5</b>
2.1- DEFINITION .....	5
2.2- POLEMIQUE.....	5
2.3- PRINCIPAUX SYMPTOMES IDENTIFIES CHEZ LES VETERANS .....	6
<b>3) RECHERCHE DES FACTEURS DE RISQUE .....</b>	<b>7</b>
3.1- ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES.....	7
3.1.1 - Syndrome de la guerre du Golfe et neurotoxiques organophosphorés.....	8
3.1.2 - Fertilité des vétérans.....	9
3.1.3 - Développement de maladies neurodégénératives.....	10
3.1.4 - Vaccinations multiples .....	11
3.1.5 - Pyridostigmine et syndrome de la guerre du Golfe .....	11
3.2- ETUDES EXPERIMENTALES.....	13
3.2.1 - Fumées toxiques et uranium appauvri.....	13
3.2.2 - Interaction de la PB avec d'autres composés chimiques.....	14
3.2.3 - Effets de l'association du stress et de la PB .....	15
<b>CHAPITRE II : PYRIDOSTIGMINE ET SYSTEME CHOLINERGIQUE .....</b>	<b>23</b>
<b>1) LE SYSTEME CHOLINERGIQUE .....</b>	<b>24</b>
1.1- BIOSYNTHESE DE L'ACETYLCHOLINE .....	24
1.2- STOCKAGE DE L'ACETYLCHOLINE .....	25
1.3- LIBERATION DE L'ACH .....	26
1.4- FIXATION DE L'ACH SUR SES RECEPTEURS .....	26
1.4.1 - Les récepteurs nicotiniques .....	26
Structure .....	27
Les différents types de récepteurs nicotiniques et leur mode d'action.....	27
Localisation et fonctions .....	28
1.4.2 - Les récepteurs muscariniques.....	28
Structure .....	29
Les différents types de récepteurs muscariniques et leur mode d'action.....	29
Localisation .....	31
1.5- DISTRIBUTION ET EFFETS BIOLOGIQUES DE L'ACH.....	31
1.6- CATABOLISME DE L'ACH .....	32
1.6.1 - Structure et localisation de l'AChE.....	33
1.6.2 - Propriétés catalytiques de l'AChE .....	33
<b>2) PB ET MYASTHENIE .....</b>	<b>34</b>
2.1- DESCRIPTION DE LA MALADIE .....	34

2.2- PREVALENCE.....	35
2.3- TRAITEMENT DE LA MYASTHENIE.....	35
2.4- EFFETS SECONDAIRES LIES AU TRAITEMENT DE LA MYASTHENIE.....	35
<b>3) TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE PAR LA PB.....</b>	<b>36</b>
3.1- DEFINITION DES NEUROTOXIQUES ORGANOPHOSPHORES.....	36
3.2- MODE D'ACTION DES NEUROTOXIQUES.....	36
3.2.1 - Action sur la synapse cholinergique.....	36
3.2.2 - Autres modes d'action des NOPS.....	37
3.3- TOXICITE LIEE AUX NOPS.....	38
3.4- ANTIDOTE LORS D'UNE INTOXICATION AUX NOPS.....	38
3.5- TRAITEMENT PROPHYLACTIQUE PAR LA PB.....	40
3.5.1 - Mode d'action de la PB.....	40
3.5.2 - Effets secondaires liés au pré-traitement.....	40
<b>4) PHARMACOCINETIQUE DE LA PB.....</b>	<b>41</b>
4.1- ABSORPTION DE LA PB.....	41
4.2- DISTRIBUTION.....	42
4.3- ACCUMULATION DE LA PB DANS LES TISSUS.....	42
4.4- METABOLISME DE LA PB.....	42
4.4.1 - Chez le Rat.....	42
4.4.2 - Chez l'Homme.....	43
4.5- EXCRETION.....	43
4.5.1 - Chez le Rat.....	43
4.5.2 - Chez l'Homme.....	43
4.6- TABLEAU RECAPITULATIF.....	44
<b>CHAPITRE III : PHYSIOLOGIE DU STRESS.....</b>	<b>45</b>
<b>1) DEFINITION DU STRESS.....</b>	<b>46</b>
<b>2) SYMPTOMATOLOGIE DU STRESS.....</b>	<b>46</b>
2.1- LA REACTION D'ALARME.....	46
2.2- LA REACTION DE RESISTANCE.....	47
2.3- LA PHASE D'EPUISEMENT.....	48
<b>3) COMPOSANTE NEUROENDOCRINE DU STRESS.....</b>	<b>48</b>
3.1- LE SYSTEME NERVEUX AUTONOME.....	48
3.1.1 - Le système sympathique.....	49
3.1.2 - Le système parasympathique.....	49
3.2- L'AXE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSO-SURRENALIEN (AXE HPA).....	50
3.2.1 - Le système hypothalamo-antéhypophysaire.....	51
3.2.2 - Le système hypothalamo-neurohypophysaire.....	51
3.2.3 - Le système hypophyso-corticosurrénalien.....	52
3.3- LES GLUCOCORTICOÏDES.....	53
3.3.1 - Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes.....	53
3.3.2 - Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes.....	54
3.3.3 - Mécanismes d'action des glucocorticoïdes.....	55
Les mécanismes génomiques.....	55
Les mécanismes non-génomiques.....	56
3.3.4 - Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes.....	57
3.3.5 - Le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes.....	57
<b>4) STRESS ET COMPORTEMENT.....</b>	<b>58</b>
<b>5) ASPECTS GENIQUES DU STRESS.....</b>	<b>58</b>
5.1- PROPRES AU STRESS.....	59
5.1.1 - Stress cellulaire et Heat Shock Proteins (Hsp).....	59
Les différentes familles d'Hsp.....	59
Rôle des Hsp.....	60
L'induction des Hsp70 (pour revue, Santoro 2000).....	60

5.1.2 - Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.....	61
Activation de NF- $\kappa$ B .....	61
Mécanismes d'activation de NF- $\kappa$ B .....	62
Gènes cibles de NF- $\kappa$ B.....	62
Répression de l'activité NF- $\kappa$ B par les glucocorticoïdes .....	63
5.1.3 - La cytokine Il-1 .....	63
Généralités.....	63
Stress et Il-1.....	64
5.2- GENES ET MODULATION DE LA MEMORISATION PAR LE STRESS.....	65
5.2.1 - Il-1 et mémorisation .....	65
5.2.2 - La voie CamKII/BDNF/TrkB .....	66
La calcium-calmoduline Kinase II (CamKII).....	66
BDNF/TrkB.....	68
Implication de CamKII, BDNF/TrkB lors des processus de mémorisation.....	68

## **MATERIELS ET METHODES ..... 71**

<b>1) ANIMAUX.....</b>	<b>71</b>
<b>2) TRAITEMENT PAR LA PYRIDOSTIGMINE .....</b>	<b>71</b>
<b>3) MODELE DE STRESS REPETE .....</b>	<b>72</b>
<b>4) TEST DU WATER-MAZE OU LABYRINTHE AQUATIQUE.....</b>	<b>73</b>
<b>5) PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES.....</b>	<b>74</b>
5.1- PRELEVEMENTS D'ECHANTILLONS SANGUINS.....	74
5.2- PRELEVEMENTS DES STRUCTURES CEREBRALES .....	74
5.3- PRELEVEMENTS DES CERVEAUX FIXES .....	74
<b>6) DOSAGE DES ARNM PAR PCR QUANTITATIVE.....</b>	<b>75</b>
6.1- EXTRACTION DES ARN MESSAGERS (ARNM) PAR LE MAGNAPURE .....	75
6.2- TRANSCRIPTION INVERSE .....	76
6.3- PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	76
6.3.1 - Dessin des amorces .....	76
6.3.2 - Réaction de polymérisation en chaîne.....	77
6.3.3 - Analyse des résultats .....	77
<b>7) DOSAGES SANGUINS ET CEREBRAUX .....</b>	<b>79</b>
7.1- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN CORTICOSTERONE .....	79
7.2- DETERMINATION DE LA CONCENTRATION PLASMATIQUE EN ALDOSTERONE .....	80
7.3- DETERMINATION DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE SANGUINE.....	80
7.4- DETERMINATION DE L'ACTIVITE CHOLINESTERASIQUE CEREBRALE .....	81
<b>8) TECHNIQUES D'IMMUNOMARQUAGES ET DE COLORATION SUR COUPES CEREBRALES.....</b>	<b>82</b>
8.1- FIXATION, INCLUSION EN PARAFFINE ET COUPES .....	82
8.2- ETUDE SUR COUPES HISTOLOGIQUES .....	83
8.2.1 - Etapes précédant la technique immunohistologique .....	85
8.2.2 - Réaction immunohistologique.....	85
8.2.3 - Les contrôles .....	86
8.2.4 - Coloration histologique classique .....	86
8.2.5 - La technique TUNEL .....	87
<b>9) ANALYSES STATISTIQUES.....</b>	<b>87</b>

## **PROTOCOLES EXPERIMENTAUX ..... 88**

<b>1) EXPERIMENTATION I : PRE-EXPERIMENTATION.....</b>	<b>88</b>
1.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	88
1.2- DEROULEMENT DE L'ETUDE .....	88

<b>2) EXPERIMENTATION II : CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES, HISTOLOGIQUES ET MOLECULAIRES SEMI-RETARDEES</b> .....	<b>88</b>
2.1- OBJECTIFS DE L'ETUDE .....	88
2.2- DEROULEMENT DE L'ETUDE .....	89
2.2.1 - Test comportemental .....	89
2.2.2 - Prélèvements .....	89
2.2.3 - Evaluation de l'expression génique.....	89
<b>3) EXPERIMENTATION III : CONSEQUENCES MOLECULAIRES PRECOCES</b> .....	<b>90</b>
3.1- OBJECTIF DE L'ETUDE.....	90
3.2- DEROULEMENT DE L'ETUDE .....	90
3.2.1 - Prélèvements .....	90
3.2.2 - Evaluation de l'expression génique.....	90

## RESULTATS

<b>1) RESULTATS DU TEST DU POLE CLIMBING AVOIDANCE (PCA)</b> .....	<b>91</b>
<b>2) PRE-EXPERIMENTATION : VALIDATION DU MODELE DE STRESS ET DU CHOIX DE LA POSOLOGIE ET DE LA VOIE D'ADMINISTRATION DE LA PYRIDOSTIGMINE</b> .....	<b>92</b>
2.1- VALIDATION DU CHOIX DU PCA EN TANT QUE MODELE DE STRESS .....	92
2.1.1 - Evolution de la concentration plasmatique en corticostérone .....	92
2.1.2 - Evolution de la concentration plasmatique en aldostérone .....	93
2.1.3 - Evolution du poids des animaux .....	94
2.2- VALIDATION DE LA VOIE D'ADMINISTRATION ET DE LA POSOLOGIE DU TRAITEMENT .....	96
2.2.1 - Cinétique de l'activité cholinestérasique (ChE) sanguine.....	96
2.2.2 - Cinétique de l'activité AChE sanguine .....	97
2.3- EFFETS DU STRESS ET DE LA PYRIDOSTIGMINE SUR LES ACTIVITES ChE ET AChE CEREBRALES .....	98
2.3.1 - Activité cholinestérasique cérébrale.....	98
2.3.2 - Activité AChE cérébrale .....	99
<b>3) EXPERIMENTATION II : EFFETS SEMI-RETARDES (J22) DU STRESS ET DU TRAITEMENT</b> .....	<b>100</b>
3.1- EFFETS SEMI-RETARDES DU STRESS ET DU TRAITEMENT SUR L'APPRENTISSAGE DES ANIMAUX .....	100
3.1.1 - Evolution du nombre d'erreurs des animaux dans le labyrinthe aquatique.....	100
3.1.2 - Evolution du temps de parcours des animaux dans le labyrinthe aquatique .....	101
3.2- EFFETS SEMI-RETARDES DU STRESS ET DU TRAITEMENT SUR LES ACTIVITES CHOLINESTERASIQUES CEREBRALES.....	102
3.2.1 - Détermination de l'activité ChE cérébrale à J22.....	102
3.2.2 - Détermination de l'activité AChE cérébrale à J22 .....	103
3.3- CONSEQUENCES HISTOLOGIQUES SEMI-RETARDEES DU STRESS ET DU TRAITEMENT.....	104
3.3.1- Validation des témoins .....	104
Témoins d'ouverture de barrière hémato-encéphalique .....	104
Contrôle négatif d'immunomarquage .....	104
3.3.2- Coloration hémalun-phloxine.....	105
3.3.3- Détection de la mort cellulaire programmée par la technique TUNEL.....	106
3.3.4- Immunomarquage anti-BrdU .....	106
3.3.5 - Immunomarquage anti-Claudine 5 .....	107
3.3.6 - Immunomarquage anti-albumine et anti-IgG .....	108
3.3.7 - Immunomarquage anti-AChE .....	108
3.4- CONSEQUENCES MOLECULAIRES SEMI-RETARDEES DU STRESS ET DU TRAITEMENT .....	113
<b>4) EXPERIMENTATION III : EFFETS PRECOCES DE L'APPLICATION REPETEE DU PCA ET DE L'ADMINISTRATION CHRONIQUE DE PYRIDOSTIGMINE</b> .....	<b>114</b>
4.1- MODULATION DE L'EXPRESSION GENIQUE OBSERVEE AU NIVEAU DES POOLS .....	115
4.1.1 - Expression génique au niveau de l'hypothalamus.....	115
4.1.2 - Expression génique au niveau de l'hippocampe .....	116
4.1.3 - Expression génique au niveau du cortex frontal.....	117
4.1.4 - Résultats de l'expression génique au niveau du striatum .....	117
4.2- EXPRESSION GENIQUE MESUREE POUR CHAQUE ECHANTILLON .....	119

4.2.1 - Expression de gènes modulés par le stress .....	119
Evolution de l'expression d'Hsp70 .....	119
Evolution de l'expression d'I- $\kappa$ B .....	120
4.2.2 - Expression de gènes impliqués dans l'activation de l'axe HPA .....	120
Evolution de l'expression d'Il-1 $\alpha$ .....	120
Evolution de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes .....	121
4.2.3 - Expression de gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation...	122
4.2.4 - Evolution de l'expression des ARNm codant pour c-Fos, c-Jun et AChE.....	123
Au niveau de l'hypothalamus.....	123
Au niveau de l'hippocampe.....	124
<b>5) SYNTHÈSE DES RESULTATS .....</b>	<b>125</b>

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>127</b>
-------------------------	------------

<b>1) VALIDATION DU MODELE.....</b>	<b>127</b>
<b>2) EFFETS DU MODELE SUR LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION C-FOS ET C-JUN .....</b>	<b>132</b>
<b>3) CONSEQUENCES COMPORTEMENTALES DU MODELE .....</b>	<b>134</b>
3.1 - EFFETS DU STRESS .....	134
3.2 - EFFETS DU TRAITEMENT PAR LA PB .....	136
3.3 - EFFETS DE L'ASSOCIATION DU STRESS ET DU TRAITEMENT PAR LA PB .....	136
<b>4) EFFETS DU MODELE SUR L'EXPRESSION GENIQUE A J12 .....</b>	<b>140</b>
4.1- EFFETS DU STRESS : .....	140
4.2- EFFETS DU TRAITEMENT PAR LA PB .....	142
4.3- EFFETS DE L'ASSOCIATION DU STRESS ET DE LA PB .....	144

<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>146</b>
---------------------------	------------

## CONCLUSION GENERALE

Liste des communications.....	152
Liste des annexes.....	153
Références bibliographiques.....	163



**- INTRODUCTION GENERALE -**



Entre août 1990 et avril 1991 s'est déroulée la première guerre du Golfe regroupant une coalition de différents pays afin de délivrer le Koweït qui venait d'être envahi par l'Irak. Au total, plus de 800 000 hommes ont été déployés pendant le conflit. Dès 1993, d'abord aux Etats-Unis puis en Grande-Bretagne, certains vétérans ont fait état de problèmes de santé, de pathologies, signes ou symptômes regroupés sous l'expression « syndrome de la guerre du Golfe ». Avant le premier semestre 2000, il n'a pas été relevé de phénomènes pathologiques en France. Depuis cette date, plusieurs dizaines de vétérans français se sont plaints de différents symptômes aussi variés que ceux de leurs confrères américains et britanniques. Depuis 2000, le Service de Santé des Armées français a donc également développé, au même titre que les Services de Santé alliés, des projets de recherche relatifs à ce sujet.

L'existence du syndrome de la guerre du Golfe, longtemps controversée, a récemment été affirmée par un rapport établi à la demande du congrès américain (*veterans'illnesses* 2008). Les enquêtes épidémiologiques conduites à ce sujet ont identifié différents facteurs de risque exposant les participants au conflit du Golfe à un risque sanitaire. Il s'agit du stress physique comme psychologique, des fumées de puits de pétrole en flamme, des pesticides et insecticides épandus massivement, des aérosols d'uranium appauvri résultant de l'explosion de certaines munitions (obus flèches), de cocktails de vaccins ainsi que de particules de gaz de combats (sarin, tabun, soman). Parmi ces agents, les différents travaux révèlent la possible implication de l'utilisation mal contrôlée de bromure de pyridostigmine (PB). Un rapport français mandaté par l'Assemblée Nationale (Salamon et al. 2001) a d'ailleurs conclu que, pour expliquer les différents troubles décrits par les vétérans, « l'hypothèse d'une relation avec la pyridostigmine ne peut être totalement exclue ». La PB est un anticholinestérasique réversible dont la prise a été ordonnée dans le cadre du pré-traitement lors d'alertes chimiques au cours de la première guerre du Golfe. Etant donné l'importance du système cholinergique dans le fonctionnement des systèmes nerveux central et périphérique, les effets secondaires possibles de la prise répétée de PB chez les vétérans apparaissent comme un point important à éclaircir. Initialement la posologie de PB, utilisée comme pré-traitement lors d'une menace chimique, avait été considérée comme non toxique. Ce n'est qu'avec l'apparition du syndrome de la guerre du Golfe que de nombreuses études épidémiologiques ont mis en cause l'usage de cette molécule et de ses effets à long terme, notamment lorsqu'elle est combinée à d'autres composés chimiques ou au stress. En effet, le récent rapport américain met en exergue une possible implication de l'association de la PB avec différents composés chimiques neurotoxiques ou avec le stress pour expliquer les troubles décrits par les vétérans.

La PB possède un ammonium quaternaire l'empêchant, dans des conditions physiologiques, de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ce composé est donc, *a priori*, dépourvu d'effets secondaires au niveau du système nerveux central. Différentes hypothèses ont été émises pour expliquer les troubles neurologiques décrits par les vétérans de la guerre du Golfe. Il a ainsi été suggéré que l'interaction entre la prise de PB et l'utilisation d'insecticides ou de pesticides puisse conduire à des effets au niveau cérébral. Il a été montré, chez la Poule et le Rat, que la prise de PB associée à l'utilisation d'insecticide

(perméthrine ou chlorpyrifos) et de répellent (DEET) conduit à des déficits neurologiques (Abou-Donia et al. 1996; Abou-Donia et al. 2001). Par ailleurs, l'association d'un stress de nage forcée avec la prise de PB chez la Souris se traduit par des effets centraux (Friedman et al. 1996). Ces résultats étant souvent controversés dans la littérature, il semble que le type de stress appliqué, sa durée et son intensité soient des paramètres importants pour l'observation des effets secondaires tardifs de la PB au niveau cérébral.

Notre équipe a alors proposé un projet entrant dans le cadre de la pharmacovigilance de la pyridostigmine utilisée en prophylaxie afin d'étudier les possibles effets secondaires du traitement, sans pour autant remettre en cause son utilisation. Ce projet a été accepté et s'inscrit au sein du Programme Opérationnel de Recherche n°5 du Service de Santé des Armées. Il s'agit d'un projet de recherche militaire entrant dans la lutte contre le risque « C » ou menace chimique. Portant sur les « effets centraux d'un pré-traitement à la pyridostigmine administré en situation de stress », ce projet est financé par la Délégation Générale pour l'Armement (DGA) dans le cadre du contrat 05co-017-05, rattaché au PEA 010807.

Le but de notre étude est de simuler, par un modèle expérimental, les conditions subies par les vétérans lors du conflit du Golfe. A ces fins, nous avons quotidiennement traités des rats par la PB et les avons soumis à un nouveau modèle de stress, dont l'originalité réside dans la possibilité pour les animaux de gérer leur stress et d'y échapper. Dans ce mémoire, nous nous attacherons donc à décrire les conséquences comportementales, histologiques et moléculaires d'un stress répété, tel que peut le subir tout combattant en opérations, associé à la prise chronique de PB. Plus particulièrement, les objectifs sont (i) de valider le modèle de stress développé au sein du laboratoire ainsi que la voie d'administration et la posologie choisies pour la PB ; (ii) d'évaluer les effets secondaires comportementaux, histologiques et moléculaires de l'association du stress et de la PB au niveau cérébral. Le choix des différents gènes modulés par le stress ou impliqués dans les processus cognitifs a été réalisé au vu des données bibliographiques ; leur expression a alors été évaluée à moyen comme à court terme. En raison de la pauvreté de la littérature scientifique sur l'expression des gènes modulée par la PB, nous avons évalué l'expression du gène codant pour l'acétylcholinestérase.

Après une présentation générale du syndrome de la guerre du Golfe et de l'implication de la PB dans le développement de ce syndrome, nous décrirons le système cholinergique, cible de la PB. Les différents aspects géniques du stress seront ensuite traités. Suite à l'exposé des méthodes utilisées, les résultats expérimentaux seront détaillés puis discutés au regard de la littérature. Enfin dans une dernière partie, nous nous attacherons à tirer les conclusions et entrevoir les principales perspectives de ce travail.

**- ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE -**



## **CHAPITRE I : Le syndrome de la guerre du Golfe**

D'août 1990 à avril 1991, le conflit contre l'Irak a regroupé une coalition de plusieurs pays principalement représentés par les Etats-Unis (700 000 hommes), la Grande-Bretagne (50 000 hommes) et la France (25 000 hommes).

Dès 1993, d'abord aux Etats-Unis puis en Grande-Bretagne, des plaintes ont été enregistrées de la part de vétérans ayant servi dans le Golfe, ceux-ci présentant une grande variabilité de symptômes. Différentes causes liées à la guerre du Golfe ont alors été évoquées pour tenter d'expliquer les symptômes observés et la notion médiatique de syndrome de la guerre du Golfe a alors émergé. Dès janvier 1994, le Ministère de la Défense américain a mis en place un comité chargé de coordonner les efforts pour répondre aux problèmes de santé des vétérans de la guerre du Golfe et a débloqué une somme considérable pour encourager les recherches nationales comme internationales sur le sujet. Ces travaux ont conduit à de nombreuses publications scientifiques.

En France, chez les combattants de la guerre du Golfe qui semblent avoir bénéficié sur le terrain d'un encadrement médical de proximité, il n'a pas été relevé de phénomènes pathologiques atypiques. Devant la non-émergence de pathologies nouvelles et/ou inexplicables de 1991 à 2000, le Service de Santé des Armées français n'a pas mis en place de surveillance spécifique ni mené d'enquête ciblée chez les anciens combattants du Golfe (ce qui se traduit par l'absence de publications référencées sur ce thème par des auteurs français). La situation a évolué à partir du 1<sup>er</sup> semestre 2000, date à laquelle plusieurs dizaines de vétérans français déployés dans le Golfe se sont plaints de différents symptômes aussi disparates que ceux de leurs confrères américains. Une association de défense des soldats victimes de la guerre du Golfe (AVIGOLFE) a alors été constituée en juin 2000. Une Mission d'Information Parlementaire présidée par le Député Cazeneuve a été mise en place en octobre 2000. Parallèlement le Ministère de la Défense a créé un groupe d'experts militaires, puis a sollicité, avec le secrétaire d'Etat à la Santé, la mise en place d'un groupe de travail indépendant « chargé de faire des propositions sur les modalités permettant d'améliorer les connaissances sur l'engagement dans le conflit du Golfe des 25 000 soldats français ». Ce rapport a été présenté au gouvernement en 2001 par le professeur Salamon (Salamon et al. 2001).

Après avoir brièvement resitué le contexte militaire du conflit du Golfe, nous définirons le syndrome de la guerre du Golfe et les principaux symptômes associés. Par la suite, nous nous attacherons à la description des différentes causes envisagées pour expliquer l'existence de ce syndrome en décrivant de façon plus détaillée les principales études évaluant l'implication du bromure de pyridostigmine (PB) dans le développement du syndrome de la guerre du Golfe.

## **1) Le conflit de la guerre du Golfe**

### **1.1- L'offensive militaire**

La guerre du Golfe, aussi appelée guerre du Koweït, est un conflit qui a opposé l'Irak à une coalition composée de différents pays. La victoire de la coalition, soutenue par l'Organisation des Nations Unies (ONU), entraîne la libération du Koweït le 26 février 1991. C'est son invasion le 2 août 1990 par l'Armée Irakienne qui avait déclenché le conflit. Le régime irakien de Saddam Hussein y poursuivait des intérêts financiers, pétroliers et stratégiques.

Différentes phases du conflit ont été distinguées :

- le début de la guerre du Golfe faisant suite à l'envoi des premiers blindés irakiens au Koweït, cette invasion, immédiatement condamnée par l'ONU (résolution 660 du 2 août 1990), a entraîné l'intervention d'une force multinationale à prépondérance américaine,
- l'opération « Bouclier du désert » au cours de l'automne 1990 voit le rassemblement de 700 000 soldats américains et de leurs alliés sur la péninsule arabique,
- l'opération « Tempête du désert » a débuté le 16 janvier 1991. Elle s'accompagne d'une offensive aérienne alliée préparant l'offensive terrestre appelée « offensive des 100 heures ». Cette dernière est le théâtre de nombreux bombardements de l'Irak et de ses troupes au Koweït,
- pour riposte, les soldats irakiens procèdent au sabotage de nombreux puits de pétrole entre le 25 et le 27 février 1991. L'offensive terrestre alliée a lieu du 24 au 28 février 1991 et se solde par la libération de Koweït city le 26 février 1991.

En ce qui concerne le bilan du conflit, les pertes alliées s'élèvent à environ 500 morts et celles de l'Irak entre 170 000 et 250 000 civils et militaires. L'Irak reconnaîtra l'indépendance du Koweït le 10 novembre 1994, conformément aux règlementations de l'ONU. Il est cependant à noter que le conflit ne s'est pas arrêté à la signature du cessez-le-feu puisque les affrontements entre troupes alliées et irakiennes n'ont jamais cessé jusqu'à la seconde guerre du Golfe qui se poursuit à l'heure actuelle.

### **1.2- L'environnement**

Dès le 16 janvier 1991, les irakiens ont procédé à de nombreux tirs de SCUD, missiles à courte portée pouvant contenir des armes chimiques ou nucléaires. L'hypothèse a alors été émise d'une éventuelle exposition à différents agents chimiques par les soldats de la coalition, comme la population locale. Le conflit a également entraîné un désastre écologique dû à l'incendie de 732 puits de pétrole koweïtiens par les forces irakiennes voulant obscurcir le ciel afin de gêner l'activité aérienne de la coalition. L'utilisation d'uranium appauvri par les troupes de la coalition porte également à polémique sur l'impact sanitaire de ce composé sur la santé des militaires ainsi que sur la population locale.

Par ailleurs, pendant l'opération « Tempête du désert » cinq alertes d'utilisation de neurotoxiques se sont avérées positives entre le 19 et le 21 janvier 1991. Les soldats ont alors pris des comprimés de PB

toutes les huit heures, comme recommandé dans le cadre d'un traitement prophylactique. La prise, par les soldats, de ce composé varie selon les pays. En ce qui concerne les troupes françaises, la date à laquelle l'ordre de prendre la PB a été donné reste incertaine. Certains rapports de l'Assemblée Nationale citent le 23 février 1991 ; le contre-ordre aurait quant à lui été émis oralement le 28 février 1991. En ce qui concerne les soldats américains et anglais, différents travaux font état d'une prise de PB pendant 2 semaines (Somani & Husain 2001). La durée de la prise du pré-traitement reste donc, à l'heure actuelle, difficile à évaluer quel que soit le pays concerné. D'autre part il n'est pas impossible que, ponctuellement, certains soldats n'aient pas respecté les consignes d'une prise toutes les huit heures.

## **2) Le syndrome de la guerre du Golfe**

### **2.1- Définition**

A la maladie due à une cause spécifique et dont les facteurs de risque ont été identifiés, on oppose le syndrome, défini comme une association de symptômes (ou de signes) d'origines diverses ou inconnues.

Depuis leur retour de la guerre du Golfe, un grand nombre de vétérans s'est plaint de symptômes dont la diversité ne peut conduire à une seule et même origine. Le terme de « syndrome de la guerre du Golfe » a alors fait son apparition (Landrigan 1997; Nisenbaum et al. 2000). Même si certains auteurs remettent en question l'existence d'un syndrome spécifique à la guerre du Golfe (Fukuda et al. 1998; Ismail et al. 1999; Doebbeling et al. 2000; Knoke et al. 2000), l'apparition de différents symptômes chez les vétérans est plus fréquente que dans la population générale.

### **2.2- Polémique**

Comme nous venons de le voir, l'existence d'un syndrome spécifique de la guerre du Golfe est controversée. Les premières études relatives à ce syndrome ont été réalisées par des questionnaires envoyés par voie postale, ce qui les entache de biais par incitation aux réponses positives et impossibilité de contrôler la qualité des informations reçues.

Les différents travaux publiés mettent en exergue une augmentation de « plaintes » chez les militaires ayant participé à la guerre du Golfe. Il semble toutefois que ces symptômes soient très divers, que leurs causes ne soient pas toujours précisées, et en tout cas certainement pas uniques. Les auteurs s'accordent généralement pour reconnaître que n'apparaît pas clairement la notion d'un syndrome évident. Les principales études menées ont principalement identifié deux facteurs : un facteur de nature psychologique et un facteur de nature somatique touchant essentiellement les articulations et les muscles. Un seul auteur conclut à l'existence d'un syndrome de la guerre du Golfe (Haley 1997) ; les autres contestent son existence (Fukuda et al. 1998; Ismail et al. 1999; Doebbeling et al. 2000; Knoke et al. 2000). La différence majeure entre ces études réside dans le fait qu'Haley a recherché les regroupements de symptômes uniquement chez un groupe de vétérans américains (Haley 1997) alors que les quatre autres études comparent les résultats obtenus chez des vétérans déployés lors de la guerre du Golfe avec ceux de

militaires non déployés, servant alors de groupe témoin (Fukuda et al. 1998; Ismail et al. 1999; Doebbeling et al. 2000; Knoke et al. 2000).

### **2.3- Principaux symptômes identifiés chez les vétérans**

Des signes et des symptômes divers, le plus souvent fonctionnels, sont retrouvés dans toutes les études épidémiologiques menées, avec une fréquence nettement supérieure chez les militaires ayant participé à la guerre du Golfe que chez les militaires témoins non déployés ou déployés ailleurs (Thomas 2006). Ces signes et symptômes correspondent le plus souvent à une fatigue chronique, une dépression, des douleurs musculo-articulaires, des diarrhées et troubles gastro-intestinaux ainsi que des perturbations cognitives et psychologiques telles que pertes de mémoire, confusion, difficulté de concentration, saute d'humeur, irritabilité et somnolence (Haley 1997; Fukuda et al. 1998; Proctor et al. 1998; Kipen et al. 1999; Unwin et al. 1999; Wolfe et al. 1999; Escalante & Fischbach 2001; Salamon et al. 2001; White et al. 2001; David et al. 2002; Kang et al. 2002; Kelsall et al. 2004; Nisenbaum et al. 2004; Gray & Kang 2006; Rose & Brix 2006; Thomas et al. 2006; Vasterling & Bremner 2006; Forman-Hoffman et al. 2007). Le **tableau 1** présente les principaux symptômes observés chez les vétérans de différents pays déployés dans le Golfe.

<b>Symptôme</b>	<b>Etats-Unis</b> (Gray & Kang 2006)	<b>Royaume-Uni</b> (Coker et al. 1999)	<b>Australie</b> (Kelsall et al. 2007)	<b>France</b> (Salamon et al. 2001)
<b>Fatigue</b>	21%	23%	23%	
<b>Maux de tête</b>	18%	18%	20%	6%
<b>Problèmes de mémoire</b>	14%	28%	11%	10%
<b>Douleurs musculaires</b>	16%	17%	15%	5%
<b>Troubles gastro-intestinaux</b>	8%	13%	10%	5%
<b>Troubles neurologiques</b>	16%	17%	8%	22%

**Tableau 1** : principaux symptômes décrits par les vétérans de différentes nationalités.

En 1997, Haley et son équipe (Haley 1997) ont identifié 3 syndromes majeurs décrits par les vétérans, chacun étant associé à des groupes de symptômes différents :

- syndrome 1 : défaut de la cognition (difficulté à se remémorer les événements, dépression, insomnie, confusion lors d'un dialogue) ;
- syndrome 2 : confusion, ataxie regroupant les symptômes : problème pour lire, écrire, ne pas savoir où ils sont ni ce qu'ils font ;
- syndrome 3 : arthro-myo-neuropathie incluant douleurs musculaires, difficulté à porter des objets lourds, engourdissement des bras ou des jambes.

Ces trois syndromes pourraient avoir une origine neurologique mais aussi psychiatrique.

En 2006, l'équipe de Salamon évalue pour la première fois les symptômes observés chez les vétérans français (Salamon et al. 2006). Cette étude conclut que, même si les soldats français n'ont pas été confrontés aux mêmes expositions que les soldats anglais ou américains, l'association de symptômes observée est similaire chez tous les vétérans. Il est cependant à noter que 14 ans après la fin de la guerre, il est difficile de décrire précisément les circonstances du déploiement des vétérans français ainsi que les conditions d'exposition et de les lier avec les symptômes alors observés.

### **3) Recherche des facteurs de risque**

Pour expliquer les troubles divers et variés observés chez les vétérans de la guerre du Golfe, huit facteurs ont été suspectés d'avoir participé à l'apparition des symptômes : le stress physique et psychologique, l'utilisation d'insecticides et de pesticides, des armes chimiques d'origine irakienne contenant des neurotoxiques organophosphorés (NOP), le recours à de la PB pour assurer la protection des militaires contre ces mêmes armes chimiques, l'utilisation par l'Armée Américaine d'obus ayant contenu de l'uranium appauvri, les polyvaccinations, les maladies infectieuses ainsi que l'émission dans l'atmosphère de toxiques, en particulier celle provoquée par les fumées d'incendies des puits de pétrole (Abou-Donia et al. 1996; Hanin 1996; Murphy et al. 1999; Nisenbaum et al. 2000; Sartin 2000; Brower 2003). De nombreuses études ont alors été conduites afin d'évaluer les liens existant entre ces expositions (seule ou combinée ; aiguë ou chronique) et l'apparition des symptômes. Ces publications associent des analyses épidémiologiques et des études expérimentales.

#### **3.1- Etudes épidémiologiques**

Le plus grand nombre d'études épidémiologiques a été réalisé auprès de militaires ayant participé à la guerre du Golfe avec comme mode de recueil de l'information un questionnaire envoyé par voie postale ou téléphonique. Elles ciblent, pour la grande majorité, les militaires américains et anglais mais aussi canadiens, australiens et français. Les échantillons étudiés ne sont généralement pas représentatifs et, bien souvent, les études ne comportent pas de groupe témoin. A ces difficultés s'ajoutent des imprécisions quant à la mesure de l'information dues à la quasi-impossibilité de recueillir des signes fonctionnels de façon fiable par auto-questionnaire. Ce mode de recueil entache également les réponses de biais puisqu'il influence les réponses. De plus, les études épidémiologiques menées sont entravées par un manque de données sur les conditions d'exposition des vétérans et par la difficulté de vérifier rétrospectivement les paramètres d'exposition. Enfin il est difficile de comparer les différentes études épidémiologiques entre elles puisqu'il n'existe pas de questionnaire unique et spécifique.

Les soldats français ont été moins exposés aux différents facteurs de risque. En effet, les conditions de combat n'ont pas été les mêmes pour les différentes armées. Par exemple, les militaires français n'ont pas été vaccinés contre le charbon et n'ont apparemment pas utilisé d'uranium appauvri. Cependant ces soldats ont pu être exposés à des poussières ou des débris d'uranium. D'autre part, les dépôts d'armes chimiques

irakiens bombardés et ayant pu relâcher dans l'atmosphère les substances toxiques qu'ils contenaient, auraient été éloignés de la zone d'intervention de l'Armée Française. Enfin les américains étaient situés dans des zones où certains insectes nuisibles étaient particulièrement nombreux, d'où un emploi intense d'insecticides par l'Armée Américaine. Quant à la part de facteurs psychologiques, du stress post-traumatique dans la genèse de ce syndrome, elle demeure difficile à évaluer mais pourrait être non négligeable.

### 3.1.1 - Syndrome de la guerre du Golfe et neurotoxiques organophosphorés (hypothèse génétique)

Durant le conflit du Golfe, cinq alertes positives concernant l'utilisation de neurotoxiques ont été enregistrées. Les soldats ont alors pu être exposés à de faibles doses de NOPs ; l'exposition à de fortes doses est peu envisageable puisqu'elle aurait alors induit des effets secondaires caractéristiques d'une intoxication et de ce fait facilement identifiable. La détoxification de l'organisme impliquant une action enzymatique, une origine génétique a été évoquée pour expliquer l'apparition des troubles liés au syndrome de la guerre du Golfe.

La butyrylcholinestérase (BuChE) est une enzyme plasmatique fortement impliquée dans l'élimination de la PB au niveau du sang. Les différences de génotypes et de phénotypes de cette enzyme pourraient ainsi conduire à des concentrations différentes de PB dans la circulation générale. En ce qui concerne le gène humain de cette enzyme, 22 mutations ont été identifiées au niveau de la région codante du gène (Soreq et al. 1994). L'une des mutations les plus fréquentes concerne la substitution de l'aspartate (présent à la position 70 de la séquence d'acides aminés) par la glycine (Neville et al. 1992). Suite à cette modification génétique, l'enzyme est moins active et de ce fait hydrolyse moins rapidement la PB (Gentry & Bitsko 1996). En ce qui concerne sa prévalence, 0,04% de la population européenne est hétérozygote pour cette forme mutée de la BuChE (Ehrlich et al. 1994).

L'hypothèse a alors été émise d'un possible lien entre le polymorphisme de la BuChE et l'apparition des symptômes chez les vétérans de la guerre du Golfe. Une seule étude (Loewenstein Lichtenstein et al. 1995) corrobore cette hypothèse. Les auteurs y décrivent le cas d'un soldat israélien, homozygote pour la forme mutée de la BuChE, présentant des symptômes accrus suite à la prise de PB. Ces symptômes sont par ailleurs augmentés au fur et à mesure des prises de PB. Les auteurs concluent alors que les vétérans présentant des symptômes plus sévères pourraient porter l'allèle muté dans leur génotype. Toutefois, cette hypothèse a par la suite été réfutée par une étude ne démontrant aucun lien entre la présence de l'allèle muté et la sévérité des symptômes décrits par des vétérans déployés comparés à des vétérans non déployés, donc non exposés aux composés chimiques (Gentry & Bitsko 1996).

Le faible nombre d'études menées sur ce sujet ne permet pas de conclure sur le lien existant entre le polymorphisme de la BuChE et les troubles développés par les vétérans. Cependant, Abou-Donia et al. suggèrent que les individus présentant une activité BuChE plasmatique réduite doivent être considérés

comme potentiellement prédisposés à un risque élevé vis-à-vis des anticholinestérasiques (Abou-Donia et al. 1996).

Une autre hypothèse génétique a principalement été évoquée par Haley (1999). L'enzyme paraoxonase (PON), identifiée au niveau du sang et du cerveau humain, est une estérase impliquée dans la détoxification de certains NOPs dont le sarin et le soman. Des études expérimentales montrent l'importance de cette enzyme dans la protection contre une intoxication aux neurotoxiques organophosphorés chez les animaux (Costa et al. 2003). Cependant des études épidémiologiques ne révèlent aucune corrélation entre le génotype permettant une meilleure capacité d'hydrolyse et la résistance au sarin (Yamada et al. 2001).

Le gène humain codant pour la PON présente un polymorphisme au niveau de 2 sites : la position 192 pouvant présenter l'arginine ou la glutamine et la position 55 présentant indifféremment la leucine ou la méthionine. La PON catalysant l'hydrolyse des insecticides et de certains NOPs, ces polymorphismes pourraient expliquer les variations interindividuelles observées lors d'une intoxication par ces composés. Le polymorphisme de la position 192 différencie 2 formes actives de la PON dénommées type Q et type R. Ces deux allozymes ne présentent pas la même efficacité d'hydrolyse des NOPs. Le type Q possède une forte réactivité pour les NOPs. Par conséquent, les personnes possédant les génotypes QQ ou QR sont caractérisés par une meilleure capacité d'hydrolyse que les individus homozygotes pour l'allèle R.

Les relations existant entre les maladies rapportées par les vétérans, le génotype PON et l'activité acétylcholinestérase (AChE) sérique ont été étudiées par Haley et son équipe (Haley et al. 1999). Les auteurs partent du fait que les vétérans malades sont plus nombreux à présenter l'allèle R et ainsi à posséder une activité enzymatique moindre de la PON. Ils émettent l'hypothèse que l'allèle R puisse être assimilé à un facteur de risque pour développer des maladies chez les vétérans. En effet, les sujets présentant des symptômes neurologiques possèdent plus souvent l'allèle R du gène codant pour la PON que l'allèle Q. Cette hypothèse a été réfutée quelques années plus tard par l'équipe de Hotopf (Hotopf et al. 2003) qui ne trouve aucune différence d'activité PON chez les vétérans présentant des symptômes et ceux n'en développant pas. De façon similaire, il a été montré que les vétérans de la guerre du Golfe présentant ou non des symptômes ne diffèrent pas selon leur activité de la paraoxonase (Concato et al. 2007).

### 3.1.2 - Fertilité des vétérans

Différentes études ont été menées afin d'évaluer l'impact du conflit du Golfe sur la fertilité des vétérans. Même si certains auteurs ont fait le lien entre le déploiement dans le Golfe et des problèmes de fertilité (Maconochie et al. 2004; Sim & Kelsall 2006) ou de fausses couches (Doyle et al. 2006), aucun effet secondaire n'a été observé chez les enfants des vétérans de la guerre du Golfe (Cowan et al. 1997; Araneta et al. 2000; Kang & Bullman 2001). Des travaux plus récents d'équipes françaises (Verret et al. 2008) comme australienne (Kelsall et al. 2007) ne montrent aucun lien entre les différentes expositions subies par les vétérans et les défauts observés chez les nouveaux-nés.

La plus grande étude conduite sur la fertilité est celle d'une équipe anglaise examinant les difficultés de conception masculine (Maconochie et al. 2004). Suite au déploiement, les auteurs montrent des effets délétères sur la fertilité. Même si les hommes ne présentant pas de problème de fertilité mettent plus de temps à concevoir, les vétérans déployés ou non dans le Golfe ne diffèrent pas par leur taux d'hormones reproductrices (Ishoy et al. 2001).

En ce qui concerne les femmes ayant servi pendant la guerre du Golfe, une seule étude montre un risque accru de grossesse extra-utérine lors de conception faisant suite au conflit (Araneta et al. 2004). Cependant cette étude a été conduite sur un petit nombre d'individus et le faible nombre d'études relatives à ce sujet ne permet pas de conclure.

### 3.1.3 - Développement de maladies neurodégénératives

Les vétérans déployés dans le Golfe n'ont pas présenté plus de décès liés à une maladie neurologique. Cependant, à leur retour de la guerre du Golfe, de nombreux soldats ont développé des troubles neurologiques représentés principalement par une asthénie généralisée et des troubles de l'attention. De façon plus surprenante, certaines études ont montré que les vétérans présentent un plus grand risque de développer une sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Smith et al. 2000; Haley 2003; Horner et al. 2003; Rose & Brix 2006). Cette pathologie, aussi appelée « maladie de Charcot », est une maladie neurologique dégénérative responsable de handicaps sévères. Les auteurs de ces études pointent le fait que cette maladie a principalement atteint des vétérans âgés de moins de 45 ans, tranche d'âge habituellement épargnée par la maladie. En effet, le pic d'apparition de la SLA dans la population civile se situe entre 55 et 75 ans et se traduit par une déficience neurologique évolutive et fatale. En 2003, différents travaux montrent un nombre deux fois plus élevé de cas de SLA chez les vétérans déployés au moins 1 mois pendant la guerre du Golfe (Horner et al. 2003). La même année, l'équipe de Haley diagnostique 20 vétérans atteints de SLA (dont 17 âgés de moins de 45 ans) (Haley 2003). Aucun de ces patients n'avait d'antécédent familial de SLA ; il ne s'agissait donc pas de formes familiales dans lesquelles l'âge d'apparition est plus précoce que dans les formes sporadiques (45 ans contre 56 ans). Ces résultats confortent l'hypothèse environnementale selon laquelle l'exposition à des produits toxiques pourrait induire le développement d'une SLA (Rose & Brix 2006).

Bien que de nombreuses études aient été conduites pour évaluer les troubles neurologiques décrits par les vétérans, deux questions restent encore, à l'heure actuelle, sans réponse :

- existe-t-il un défaut neurologique spécifique des vétérans de la guerre du Golfe ?
- le syndrome de la guerre du Golfe correspond-il à une aggravation de symptômes liés à une maladie neurologique ?

### 3.1.4 - Vaccinations multiples

Les polyvaccinations sont considérées par les épidémiologistes américains et britanniques comme l'une des causes potentielles du « syndrome de la guerre du Golfe » les plus crédibles.

L'origine de l'hypothèse d'une implication des vaccinations dans le développement des symptômes du syndrome de la guerre du Golfe date de 1997. A cette époque, deux auteurs envisagent que les symptômes présentés par les vétérans de la guerre du Golfe seraient liés à un déséquilibre de cytokines (produits par les lymphocytes T helper (LTh) de type 1 et 2) suite à des vaccinations administrées pendant un stress opérationnel et l'utilisation simultanée de pesticides (Rook & Zumla 1997). Les polyvaccinations induiraient la production de cytokines liées aux LTh<sub>2</sub> dans des conditions stressantes. Cette hypothèse a par la suite été réfutée par différentes équipes (Soetekouw et al. 1999; Zhang et al. 1999) qui se sont attachées à différencier deux groupes de vétérans, l'un symptomatique, l'autre non.

Par la suite, différentes études conduites par les américains (Unwin et al. 1999), les anglais (Cherry et al. 2001) comme les australiens (Kelsall et al. 2004) ont établi un lien entre les multiples vaccinations reçues par les vétérans et l'apparition de différents symptômes. En effet, à côté des vaccinations usuelles, le programme américain intégrait des vaccinations contre le botulisme et le charbon (ou anthrax), tandis que le programme anglais avait choisi de protéger ses troupes contre la peste et le charbon avec comme adjuvant un vaccin contre la coqueluche. Au cours de l'opération « Tempête du désert », 41% des soldats américains et 75% des soldats anglais ont été vaccinés contre l'anthrax. Ces vaccins ont été suspectés, par la majorité des études anglaises, pour leur incidence sur les symptômes observés chez les vétérans à leur retour du conflit (Unwin et al. 1999; Hotopf et al. 2000; Cherry et al. 2001). Le débat lié à l'utilisation de ces vaccins tient au fait qu'aucun essai clinique n'a été réalisé pour leur utilisation, à la différence de tous les autres vaccins utilisés aux Etats-Unis.

En ce qui concerne les vétérans français, contrairement aux troupes anglaises et américaines, ils n'ont pas reçu de vaccin contre l'anthrax ou le botulisme. Une étude récente évaluant les conséquences de la guerre du Golfe sur les vétérans français ne révèle aucun lien entre les vaccinations reçues par les vétérans et le développement de troubles (Salamon et al. 2006).

### 3.1.5 - Pyridostigmine et syndrome de la guerre du Golfe

Différentes études épidémiologiques se sont basées sur l'hypothèse de l'existence d'un lien entre la prise de PB et les symptômes chroniques décrits par les vétérans (Keeler et al. 1991; Sharabi et al. 1991; Haley 1997; Unwin et al. 1999; Kelsall et al. 2004; Kelsall et al. 2005).

Juste après le conflit, une étude rétrospective interrogeant des personnels médicaux chargés du suivi des soldats américains ayant pris de la PB (pour la grande majorité pendant 6 à 7 jours) a été réalisée (Keeler et al. 1991). Les principaux symptômes décrits sont des troubles mineurs du système gastro-intestinal et une sensation de fatigue. Ces mêmes symptômes sont décrits par les soldats israéliens (Sharabi et al. 1991). Les auteurs ont alors conclu que la PB peut être administrée à tous les soldats, en cas de

menace chimique, puisque les effets aigus dus à la prise de cette molécule sont modérés et compatibles avec la poursuite de la mission.

En 1997, Haley et son équipe (Haley 1997) identifient certains symptômes chroniques neuropathologiques (cognition, confusion, arthro-myo-neuropathie) comme pouvant être liés à la prise de la PB. Cependant cette étude est controversée puisque ces résultats n'ont été validés ni par des études toxicologiques, ni par des études cliniques. De plus certains points restent délicats, notamment le choix des tests neuropsychologiques utilisés, ainsi que leur utilisation et l'interprétation faite des résultats. Cette étude a été réalisée sur un petit nombre de vétérans et ces résultats ne sont comparés à aucun groupe témoin (constitué de vétérans non déployés).

Plus récemment, une autre étude américaine a évalué les différentes expositions subies par les vétérans déployés dans le Golfe pendant la période du 2 août 1990 au 31 juillet 1991, et présentant un symptôme de fatigue chronique (Lucas et al. 2007). Les auteurs concluent que la prise de PB de façon continue, pendant la guerre du Golfe, a fortement contribué à l'apparition de la fatigue ressentie par les vétérans.

Même si certaines études ont montré, chez les vétérans australiens, l'implication de la PB dans l'apparition de différents troubles (Kelsall et al. 2004; Kelsall et al. 2005), ces résultats n'ont été retrouvés ni chez les américains (Unwin et al. 1999) ni chez les anglais (Cherry et al. 2001). De plus, un travail portant sur des troupes canadiennes impliquées dans le conflit ne montre aucun lien entre les troubles ressentis par les soldats et la prise de PB (Canadian Department of National Defense, 1998) (rapport Salamon).

L'étude rétrospective cas-témoins de Spencer (Spencer et al. 2001) s'est attachée à rechercher la contribution potentielle d'un grand nombre de facteurs auxquels les vétérans ont pu être soumis au cours du conflit, parmi lesquels le stress et la prise de PB. Les auteurs ont recherché les facteurs de risque auxquels ont pu être soumises trois sous-populations de vétérans :

- les vétérans ne présentant aucun symptôme du syndrome de la guerre du golfe ;
- ceux présentant au moins un type de symptôme (douleurs, troubles cognitifs ou fatigue) ;
- ceux présentant des symptômes d'au moins deux types.

Les résultats de cette étude montrent que la prise de pyridostigmine chez les vétérans ayant subi un stress élevé se traduit par une forte augmentation du risque de présenter au moins un type de symptômes. De plus chez les vétérans présentant des symptômes de plusieurs types, la prise de PB associée à des conditions de combat fortement stressantes augmente encore la valeur du risque relatif. Les auteurs mettent ainsi en évidence un effet de la combinaison du stress de combat et de la prise de PB.

De l'analyse des données épidémiologiques le rapport Salamon, mandaté par l'Assemblée Nationale, conclut que pour expliquer certains troubles décrits par les vétérans « l'hypothèse d'une relation avec la pyridostigmine ne peut être totalement exclue ». Pourtant les résultats des études épidémiologiques ne permettent pas de conclure quant aux types d'exposition engendrant les troubles décrits par les vétérans.

Comme précisé précédemment, durant leur déploiement dans le Golfe, les soldats ont été exposés à différents types de stress (physiques et psychologiques) mais également à de nombreuses substances chimiques. Diverses études expérimentales ont alors été conduites afin d'évaluer les effets secondaires liés à l'utilisation de produits chimiques associés ou non à un évènement stressant.

### **3.2- Etudes expérimentales**

#### **3.2.1 - Fumées toxiques et uranium appauvri**

Au cours du conflit, un grand nombre de puits de pétrole ont été incendiés dans la région du Golfe arabo-persique. La fumée de ces incendies a été inhalée par de nombreux soldats qui ont alors souffert de différents symptômes de type pulmonaire et développé asthme ou bronchite. Pourtant, les différents rapports français comme américain concluent qu'il semble peu vraisemblable que les fumées des puits de pétrole en feu puissent être la cause des divers signes observés chez les vétérans du conflit du Golfe (Salamon et al. 2001; veterans'illnesses 2008).

L'uranium est un métal naturellement présent à l'état de traces dans l'environnement, dans l'alimentation et les organismes vivants. Dans l'environnement, l'uranium naturel se compose de trois isotopes naturels  $^{238}\text{U}$  (99,28%),  $^{235}\text{U}$  (0,718%) et  $^{234}\text{U}$  (0,056%). L'uranium naturel n'étant pas assez concentré en  $^{235}\text{U}$  pour être utilisé comme combustible nucléaire, il doit être enrichi en cet isotope jusqu'à des taux de 3 à 4%. L'uranium appauvri correspond au sous-produit après enrichissement de l'uranium naturel. Il contient environ 0,2 à 0,3% de  $^{235}\text{U}$  et moins de 0,001% de  $^{234}\text{U}$ . Depuis les années 60 l'uranium appauvri, de par ses propriétés métallurgiques, a trouvé des débouchés dans les domaines militaires mais également dans le civil. On l'utilise à des fins médicales pour fabriquer des boucliers de protection contre les rayons X, pour le blindage (tête d'obus perforants ou plaque de chars d'assaut) ou le lestage (contreponds dans les quilles de bateaux ou les ailes d'avion).

L'uranium appauvri a été utilisé dans des munitions et des armes présentes dans les tanks américains. Contrairement aux américains, aucune munition à uranium appauvri ne semble avoir été employée par les forces françaises dans le Golfe. Ainsi, si la question de l'exposition des soldats à l'uranium appauvri a été tardivement envisagée en France, il n'en a pas été de même aux Etats-Unis et en Grande-Bretagne, où des programmes d'études épidémiologiques et environnementales ont été lancés, respectivement en 1994 et 1998.

L'inhalation de poussières d'uranium est, de loin, la voie la plus fréquente de contamination par ce composé. L'absorption percutanée et l'implantation sous-cutanée constituent des voies de pénétration pouvant également conduire à des contaminations. Suite à une contamination par l'uranium, la toxicité résulterait de la combinaison des propriétés chimiques (en tant que métal) et radiologiques (émetteur de rayonnements ionisants) de ce composé. Si l'on considère la radioactivité alpha, la seule préoccupante en contamination interne, l'uranium appauvri est deux à trois fois moins radioactif que l'uranium naturel. De ce fait, sa toxicité serait avant tout chimique (Leggett 1989; Taylor & Taylor 1997). La principale cible de

l'uranium étant le rein (Brown 2006), une intoxication par ce composé se traduit par un défaut des fonctions rénales chez le rat (Leggett 1989).

L'uranium appauvri induit des tumeurs d'ostéoblastes humains *in vitro* (Miller et al. 1998; Miller et al. 2003) et présente une action au niveau des gonades de rat (Domingo 2001). D'autres études ne montrent aucun effet de l'uranium sur les capacités reproductrices de ces animaux (Arfsten et al. 2006). Rien ne permettrait donc de considérer l'uranium appauvri comme responsable d'un présumé syndrome de la guerre du Golfe. Pour étayer cette hypothèse, une étude utilisant un modèle mathématique a démontré que l'exposition des personnels militaires à l'uranium appauvri durant le conflit du Golfe a été trop faible pour expliquer, à elle seule, les effets secondaires décrits par les vétérans (Marshall 2008).

Pendant la guerre du Golfe, les vétérans ont reçu de la PB comme traitement prophylactique et ont également été exposés à différents composés chimiques tels que des insecticides et des insectifuges. Plusieurs études ont alors évalué les effets de la combinaison de tels composés chez l'animal.

### 3.2.2 - Interaction de la PB avec d'autres composés chimiques

Il a été envisagé que l'intoxication par les insecticides, la prise de PB ainsi que leur combinaison puissent conduire à des effets neurologiques (Haley & Kurt 1997). Les principales études conduites ont alors utilisé un modèle expérimental, reproduisant les risques chimiques auxquels ont pu être exposés les vétérans, en combinant trois composés utilisés par les vétérans : la PB, le DEET (N,N-diéthyl-m-toluamide) servant d'insectifuge (ou répellent) et la perméthrine ou le chlorpyrifos servant d'insecticide.

Dans leurs travaux, Abou-Donia et son équipe administrent de la PB (5 mg/kg/jour, *p.o.*), du DEET (500 mg/kg/jour, *s.c.*) et/ou du chlorpyrifos (10 mg/kg/jour, *s.c.*) à des poules (Abou-Donia et al. 1996). Les auteurs montrent alors que la co-administration de ces trois composés induit des déficits neurologiques sévères et une diminution de l'activité AChE cérébrale, due à l'action du chlorpyrifos. Quelques années plus tard, les mêmes auteurs montrent que l'exposition concomitante de la PB, du DEET et de la perméthrine induit des altérations spécifiques du système cholinergique chez le Rat (Abou-Donia et al. 2001). De plus, leur association avec le stress augmente leur effet neurotoxique chez le Rat (Abdel-Rahman et al. 2004).

En 2000, l'équipe de Chaney émet l'hypothèse que les altérations de perméabilité membranaire induites par le DEET puissent faciliter l'accès de la PB au niveau du système nerveux central (SNC) (Chaney et al. 2000). Les auteurs administrent alors de la PB (1-3 mg/kg, *i.p.*), du DEET (200 mg/kg, *i.p.*) ou les deux composés à des rats mâles Sprague-Dawley. Après une heure de traitement, l'administration de DEET seul n'induit aucune modification de l'activité cholinergique périphérique ni cérébrale. La PB seule n'altère pas cette même activité AChE centrale, par contre l'association du DEET et de la PB (3 mg/kg) se traduit par une inhibition (-40%) de l'activité AChE cérébrale (cerveau entier). Même si l'association de ces deux composés se traduit par des effets au niveau du SNC, il est à noter que les doses administrées induisent une inhibition de l'activité AChE périphérique très supérieure à celle recommandée lors de

l'utilisation de la PB par les vétérans lors du conflit du Golfe. En effet, la dose minimale de PB (1mg/kg) administrée aux animaux lors de cette étude se traduit par une inhibition de 80% de l'activité AChE sanguine.

Ces principales études montrent que des interactions entre la PB et d'autres composés chimiques ont pu conduire à des troubles chez certains vétérans. Une des questions qui se posent alors est de savoir si cet effet est d'origine centrale ou périphérique. Comme elle possède un ammonium quaternaire, la PB ne peut pas, *a priori*, franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant pour Wolthuis et son équipe (Wolthuis & Vanwersch 1984; Wolthuis et al. 1995), les effets observés seraient d'origine centrale et montreraient que, contrairement à ce que l'on croyait alors, une certaine quantité de PB passerait la BHE. Néanmoins ces auteurs n'ont effectué aucune mesure du passage de la PB dans le cerveau. Il a aussi été avancé l'hypothèse que la PB ne passe pas dans le SNC dans les conditions normales mais que cette molécule pourrait franchir la BHE lors d'un stress comme celui rencontré lors de situations de combat.

### 3.2.3 - Effets de l'association du stress et de la PB

De nombreux travaux ont été menés afin d'évaluer si le stress combiné à un traitement par la PB se traduit par des effets au niveau du SNC. Les résultats de ces études sont souvent contradictoires mais la plupart concluent que le stress ne favorise pas le passage de la PB au niveau cérébral. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par le fait que plusieurs facteurs jouent un rôle dans les effets du stress sur le SNC, et en particulier le type de stress, son intensité, sa chronicité ainsi que le sexe et l'âge des animaux.

Quatre hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer les effets de l'association du stress et de la prise de PB.

- Le stress induit une altération de la BHE entraînant un passage de la PB ou de ses métabolites au niveau cérébral ;
- La PB pénètre dans le cerveau par des régions dépourvues de BHE. Cependant, dans ce cas, les effets centraux de la PB seraient également observés sans stress ;
- La PB interagit avec les estérases des cellules endothéliales des capillaires cérébraux et modifie ainsi la perméabilité de la BHE à des substrats physiologiques ;
- La PB ne présente aucune action au niveau de la BHE mais agit *via* des mécanismes indirects résultant de son action au niveau périphérique. En effet, elle interagit avec de nombreuses synapses cholinergiques impliquées dans les réponses au stress.

Dans cette partie, nous présenterons les travaux conduits par différentes équipes et montrant ou non les effets de la PB au niveau cérébral suite à un évènement stressant.

#### Travaux montrant des effets centraux (Cf tableau 2)

Friedman et al. (Friedman et al. 1996) ont été les premiers à décrire les effets centraux de la PB administrée dans des conditions de stress. Cependant ces résultats n'ont jamais pu être reproduits par

d'autres équipes. Des souris FVB/N sont soumises à un stress de nage forcée (deux sessions de 4 min, séparées par une pause de 4 min) puis traitées par la PB (0,1 mg/kg, *i.p.*) 10 min après la fin de ce stress. Les animaux sont sacrifiés 10 minutes après le traitement. L'association stress-PB se traduit par une inhibition de 50% de l'activité AChE du cortex cérébral par rapport aux animaux traités mais non stressés. Par ailleurs, l'administration intracardiaque de bleu Evans aux animaux anesthésiés a permis la mise en évidence d'une ouverture de la BHE consécutive au stress associé à la prise de PB. Les auteurs montrent une activation de l'oncogène c-Fos (dans l'hippocampe) et une inhibition de l'activité AChE cérébrale sans toutefois avoir dosé la PB au niveau du SNC.

La cascade de mécanismes proposée est la suivante : (i) l'ouverture de la BHE suite au stress pourrait faciliter le passage de la PB au niveau cérébral ; (ii) l'inhibition de l'activité AChE cérébrale induirait une augmentation de la teneur en acétylcholine (ACh) dans la synapse, une activation des récepteurs muscariniques, l'induction de signaux de transduction, l'expression de l'ARNm de cFos et l'augmentation de la transcription d'AChE. Ainsi, si à l'origine, une inhibition de l'activité AChE est observée, à moyen terme il se produit une augmentation de cette activité, pouvant plus tard se traduire par une déplétion persistante en ACh, une diminution de l'excitabilité neuronale, voire une atteinte des fonctions cognitives (Kaufer et al. 1998).

Beck et al. (Beck et al. 2001) se sont intéressés à la réponse à un son chez des rats Sprague-Dawley traités par la PB (0,045 mg/mL, *p.o.*) et soumis à un stress pendant 7 jours (immobilisation ; 1h par jour). Les auteurs n'observent aucune modification de la réponse de sursaut au son chez les animaux chez les animaux stressés et traités. Par contre, le traitement seul ou le stress seul augmentent cette réponse.

Tian et al. (Tian et al. 2002) décrivent, chez le Rat, une inhibition transitoire de 21 à 28% de l'activité AChE cérébrale (cervelet et hippocampe) par la PB, 1 à 4 heures après un stress de nage (15 min) ou de marche forcée (20 à 90 min). Il est cependant à noter que le stress ne majore que très faiblement les effets dus à la PB seule (30 mg/kg, *p.o.*).

Abdel-Rahman et al. (Abdel-Rahman et al. 2002) mettent particulièrement bien en évidence un effet de synergie lorsqu'un stress de contention modéré et répété (5 min par jour pendant 28 jours) est appliqué à des rats adultes, traités de manière chronique par trois drogues utilisées lors de la guerre du Golfe : la PB (1,3 mg/kg/jour, *p.o.*), le DEET (40 mg/kg/jour, dermique) et la perméthrine (0,13 mg/kg/jour, dermique). Alors que le stress ou le traitement par les trois drogues n'ont que très peu d'effets au niveau cérébral et aucun effet au niveau hépatique, leur association se traduit par :

- une rupture significative de la BHE dans différentes structures cérébrales : le cortex cingulaire, le thalamus, l'hypothalamus et le gyrus denté de l'hippocampe ;
- une dégénérescence neuronale révélée par coloration hématoxyline-éosine et coloration à l'argent. Cette neurodégénérescence est observée dans de nombreuses structures cérébrales dont celles où la perméabilité de la BHE est fortement augmentée ;

- une forte réaction astrocytaire révélée par immunomarquage de la GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ;
- une diminution de la densité en récepteurs muscariniques dans le striatum, qui est aussi observée si le stress est appliqué seul ;
- une inhibition de l'activité AChE du striatum ;
- une atteinte hépatique avec fibrose portale et périportale. Selon les auteurs, cette atteinte hépatique pourrait diminuer le processus de détoxification et conduire à augmenter la disponibilité des agents chimiques et ainsi exacerber leurs effets cérébraux.

Il est alors suggéré que l'exposition simultanée aux agents et au stress, d'une part, augmente la perméabilité de la BHE et, d'autre part, crée des dommages hépatiques, compromettant ainsi la capacité de détoxification des agents par le foie. Ceci aurait pour conséquence l'augmentation de la concentration plasmatique de ces agents, dont la PB, favorisant ainsi son passage au niveau central. Ce passage se traduit en retour par une inhibition de l'activité AChE cérébrale. Il est à regretter que ces auteurs n'aient pas étudié les effets de la combinaison du stress et de la PB.

Beck et al. (Beck et al. 2003) ont mis en évidence une inhibition de l'activité AChE du striatum (-30%) chez le Rat soumis à 60 chocs électriques (3 s, 2 mA) à la queue, délivrés de façon intermittente sur une période d'une heure, puis traités, 10 min après la fin de l'application du stress, par une dose unique de PB (2 mg/kg, *i.p.*) ; les animaux ont été sacrifiés à différents temps après l'administration de PB : 5, 10 et 20 min. Les animaux traités mais non soumis au stress ne présentent aucune inhibition de l'activité AChE dans les structures cérébrales étudiées (cortex, striatum, cervelet et hippocampe). Dans les mêmes conditions de stress, si les animaux sont traités par un autre anticholinestérasique, la néostigmine, les auteurs observent une inhibition de l'activité AChE dans le cortex et le cervelet, et aucune modification dans le striatum.

Taysse et al. (Taysse et al. 2005) soumettent des souris mâles BALB/C à deux stress combinés (immobilisation et choc plantaire) pendant 12 jours. La PB (0,2 mg/kg, *s.c.*, 2 fois par jour) est administrée pendant les 5 derniers jours de stress. Les auteurs montrent que la combinaison de ces deux types de stress augmente l'expression de c-Fos au niveau de l'hippocampe, du thalamus et du cortex pyriforme. L'administration de PB seule se traduit par des effets centraux puisque l'expression de l'oncogène c-Fos est augmentée dans les différentes structures étudiées. De plus, la combinaison du stress et de la PB induit une augmentation des taux de l'acide 5-hydroxyindolacétique, un métabolite de la sérotonine, au niveau des différentes structures cérébrales. Enfin la PB semble, en condition de stress, activer le système dopaminergique comme en témoigne l'augmentation des taux de dopamine dans l'hippocampe et le striatum suite à l'association du stress et de la PB. Les auteurs concluent alors que la PB, administrée à des animaux stressés, pourrait affecter certaines fonctions cérébrales sans pour autant avoir démontré le passage de la PB au niveau du SNC.

Baireddy et al. (Baireddy et al. 2007) étudient, chez des rats mâles Sprague-Dawley, les effets de la PB (30 mg/kg, 1 mL/kg, *p.o.*) administrée immédiatement après l'application de différents stress (contention (60 min), marche (15 min) et nage forcées (15 min)). Les animaux sont sacrifiés 2 heures après l'évènement stressant. Les résultats de cette étude suggèrent que la PB, administrée ou non suite à un stress, n'induit aucun signe de toxicité cholinergique. Cependant la PB seule induit une inhibition de l'activité ChE faible mais significative au niveau du cervelet. Cet effet n'est pas majoré par le stress.

L'administration chronique de PB (10 mg/kg/jour, minipompes implantées) pendant 7 jours à des souris mâles, se traduit par une inhibition de l'activité cholinergique au niveau de l'hypothalamus (Ropp et al. 2008). Ce traitement induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'AChE dans l'hypothalamus et le cortex. Il est cependant à noter que la posologie choisie pour l'administration de la PB aux souris est élevée (10 mg/kg contre 0,2 mg/kg pour Taysse et 0,1 mg/kg pour Friedman, travaillant respectivement en sous-cutanée et en intra-veineuse). De plus l'hypothalamus, comme souligné par les auteurs, est une zone dépourvue de BHE puisqu'il contient des organes circumventriculaires.

*Travaux ne montrant pas ou peu d'effets centraux (Cf tableau 3)*

Lallement et al. (Lallement 1998) ont soumis le cobaye à un stress thermique permettant de moduler l'intensité du stress et ainsi d'observer trois conditions expérimentales (stress modéré, moyen ou extrême correspondant respectivement à des températures corporelles de 39,8°C ; 41,5°C ; 44,3°C). Les effets stressants ont été appréciés par la mesure du cortisol plasmatique. Les animaux ont été traités par la PB (0,2 mg/kg, *s.c.*) 90 minutes après le début de l'application du stress et sacrifiés 30 min après cette administration. Le passage central de la PB a été mesuré indirectement par ses effets sur l'inhibition de l'AChE mais aussi directement par autoradiographie avec l'utilisation de PB tritiée. Dans aucune de leurs conditions expérimentales, les auteurs n'ont mis en évidence de passage central de la PB.

Telang et al. (Telang et al. 1999) ne montrent aucun passage de PB marquée au carbone 11 dans le cerveau de souris soumises à une nage forcée. Il faut noter que la quantité de PB administrée par voie intra-veineuse est très faible : 1 picomole soit environ 5 ng/kg de poids corporel.

Grauer et al. (Grauer et al. 2000) ont réalisé plusieurs conditions expérimentales dont l'une reproduit exactement celle de Friedman (Friedman et al. 1996). Ils ont utilisé des souris mâles ou femelles FVB/N ou CD1, recevant un traitement aigu par la PB (0,2 mg/kg, *i.m.* ou *i.p.*) 10 min après deux types de stress (nage forcée et/ou contention) mimant un stress modéré ou sévère. Quelles que soient les conditions de l'étude, aucun passage de la PB dans le SNC par mesure de l'inhibition de l'AChE n'a été révélé. Les auteurs n'ont donc pas, avec la même souche de souris et le même modèle de stress, retrouvé les résultats publiés par Friedman et al. (Friedman et al. 1996).

Sinton et al. (Sinton et al. 2000) ont utilisé deux souches de rats (Long Evans et Wistar) et deux types de stress (contention et/ou nage forcée) pour vérifier si les effets observés dépendent du type de souche de rongeur ou du type de stress. Les auteurs mettent en évidence une augmentation de l'activité AChE

cérébrale et non une inhibition, chez les rats des deux souches traités par la PB (dose comprise entre 0,5 et 5 mg/kg, *i.p.*) 10 min après le stress. Ces auteurs concluent donc que les deux types de stress utilisés diminuent la perméabilité de la BHE à la PB. Ils suggèrent que les travaux de Friedman et al. (1996) pourraient être dus à une perfusion insuffisante des cerveaux de rat lors du prélèvement, comme le suggèrent les travaux de Ovadia et al. (Ovadia et al. 2001). En effet, la non perfusion du tissu cérébral peut conduire à estimer, de façon erronée, une inhibition de 8 à 12% de l'activité AChE en raison de la persistance du sang au niveau du SNC.

Kant et al. (Kant et al. 2001) ont mesuré, chez des rats Sprague-Dawley, l'activité AChE du cortex cérébral après administration continue de PB durant trois jours (1,5 mg/kg/jour, minipompes), combinée à un stress de choc électrique plantaire intermittent. Aucune inhibition significative de l'activité enzymatique corticale n'a été détectée.

Song et al. (Song et al. 2002) administrent une dose unique de PB à forte dose (30 mg/kg, *p.o.*) ou une administration répétée (0,3 ou 10 mg/kg/jour, pendant 14 jours) à des rats soumis à différents protocoles de contention (contention unique de 1 à 4 heures ou contention d'une heure répétée pendant 14 jours). Aucune majoration des effets centraux de la PB, ni de modification de la perméabilité de la BHE à la peroxydase n'est observée.

Plus récemment, Park et collaborateurs (Park et al. 2008) administrent de la PB (1 mg/kg, 5 mL/kg, *p.o.*) à des rats 20 min avant et toutes les deux heures pendant un stress de contention et d'immersion dans l'eau froide. L'absence d'inhibition de l'activité AChE cérébrale (au niveau du cerveau entier) témoigne d'une absence de passage de la PB au niveau central.

Globalement, les observations de Friedman et al. n'ont jamais pu être reproduites. Ainsi la littérature est plutôt en faveur de l'absence de passage de la PB dans le SNC lors d'un stress. Toutefois, on ne peut pas exclure, *a priori*, le fait qu'un ou plusieurs métabolites actifs de la PB (par exemple le 3-HMP) aient une action cholinergique centrale (hypothèse formulée par Shih et son équipe (Shih et al. 1991).

La synthèse de ces différents travaux met en évidence que l'administration orale et répétée de PB, associée ou non à un stress, peut induire une inhibition de l'activité acétylcholinestérasique cérébrale, inhibition dépendante de la structure étudiée et du délai d'observation. Toutefois cette inhibition de l'activité AChE cérébrale, lorsqu'elle a été décrite, n'a jamais été corrélée à la présence de la molécule de PB dans le tissu cérébral. En effet l'inhibition de l'activité AChE n'est qu'un marqueur indirect de la présence de PB. Les techniques de dosage classiques de la PB par chromatographie à haute performance en phase liquide (HPLC) ou chromatographie en phase gazeuse couplées à la spectrométrie de masse, n'ont pas une sensibilité suffisante pour doser la PB dans le tissu cérébral. Seules deux équipes, celle de Meyer (Meyer et al. 1988) et celle de Miller et Verma (Miller & Verma 1989) ont développé leurs propres anticorps anti-PB. Ces deux équipes ont ainsi mis en évidence la présence de PB dans le cerveau de rat non

soumis à un stress. Il est cependant important de spécifier que les doses de PB alors administrées sont très élevées (0,056 mg/kg, *i.m.* pour Meyer et 1 mg/kg, *i.m.* pour Miller).

Les effets observés peuvent fluctuer en fonction de l'intensité du stress. La diversité des conditions de stress et des agents auxquels les vétérans du conflit du Golfe ont pu être soumis peut expliquer les différentes formes de syndrome observées et la proportion de personnes atteintes. Le degré avec lequel de possibles interactions entre la PB et d'autres composés chimiques ou le stress ont pu conduire à des troubles chez certains vétérans est encore inconnu. En effet il est, à l'heure actuelle, impossible de savoir quels soldats ont été traités et par quel type de composé. De plus, il est difficile d'extrapoler les données expérimentales, obtenues chez les animaux, aux vétérans.

Espèce animale	Traitement	Délai d'observation	Type de stress	Observations	Référence
Souris FVB/N	PB (0,1 ; 0,5 ou 1 mg/kg), <i>i.p.</i> 10 min après le stress	10 min après le traitement à la PB	Nage forcée (2 fois 4 min)	- inhibition 50% AChE corticale - entrée du bleu evans au niveau du SNC - activation expression cFos dans l'hippocampe	(Friedman et al. 1996)
Rat Sprague-Dawley	PB (0,045 mg/mL), <i>p.o.</i> pendant 7 jours	24 h à 14 jours après dernier traitement	Stress d'immobilisation pendant 1 h par jour	Stress-PB : pas de modification de la réponse de sursaut à un son (traitement ou stress seul augmentant cette réponse)	(Beck et al. 2001)
Rat Sprague-Dawley	PB (30 mg/kg), <i>p.o.</i> Avant, pendant ou après le stress	1, 2 ou 3 h après le traitement	Nage forcée (15 min) ou course forcée (20-90 min)	Stress-PB : Inhibition transitoire de l'activité AChE cérébrale au niveau cervelet et hippocampe Le stress ne majore que faiblement l'effet de la PB seule.	(Tian et al. 2002)
Rat Sprague-Dawley	PB (1,3 mg/kg/jour), <i>p.o.</i> pendant 28 jours Association avec DEET (40 mg/kg/jour) et perméthrine (0,13 mg/kg/jour)	24 h après le dernier traitement	Stress modéré : contention de 5 min tous les jours immédiatement après le traitement	Stress + les trois drogues : rupture de la BHE dans différentes structures cérébrales qui présentent alors une neurodégénérescence Forte réaction astrocytaire Inhibition de l'activité AChE du striatum Diminution nombre de récepteurs muscariniques dans le striatum (également si stress seul)	(Abdel-Rahman et al. 2002)
Rat Sprague-Dawley	PB (2 mg/kg) <i>i.p.</i> 10 min après le stress	5, 10 et 20 min après traitement	Choc électrique intermittent au niveau de la queue pendant 1 h	Stress-PB : inhibition de l'activité AChE du striatum	(Beck et al. 2003)
Souris BALB/C	PB (0,2 mg/kg) <i>s.c.</i> 2 fois par jour pendant les 5 derniers jours de stress	1 h après la dernière session de stress	Immobilisation (30 min) + choc plantaire (60 min) pendant 12 jours	Stress comme PB : augmentation expression cFos dans hippocampe, thalamus et cortex piriforme Stress-PB : augmentation taux dopamine dans l'hippocampe et le striatum	(Taysse et al. 2005)
Rat Sprague-Dawley	PB (30 mg/kg, 1 mL/kg) <i>p.o.</i> juste après le stress	2 h après le stress	Contention (60 min)+marche ou nage forcée (15 min)	PB seule ou associée au stress : aucun signe de toxicité PB induit inhibition activité ChE au niveau du cervelet. Effet non majoré par le stress	(Baireddy et al. 2007)

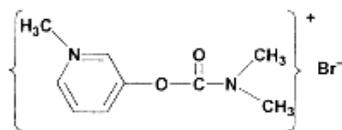
**Tableau 2 :** tableau récapitulatif des différentes études démontrant les effets de la pyridostigmine au niveau du SNC, lorsqu'elle est combinée à un stress.

Espèce animale	Traitement	Délai d'observation	Type de stress	Observations	Référence
Cobaye Dunkin-Hartley	PB (0,2 mg/kg) <i>s.c.</i> 90 min après le début du stress	30 min après le traitement à la PB	Stress thermique (modéré, moyen ou extrême) pendant 2 h	Aucun effet central de la PB (inhibition AChE et autoradiographie grâce à PB tritiée)	(Lallement 1998)
Souris Swiss-Webster	PB (1 $\mu$ Ci de <sup>11</sup> C-PB) <i>i.v.</i> , 10 min après le stress	10 min après le traitement	Nage forcée (2 fois 4 min)	Stress-PB : pas de passage de PB marquée	(Telang et al. 1999)
Souris FVB/N ou CDI Mâles ou femelles	PB (0,4 mg/kg) <i>i.m.</i> ou <i>i.p.</i> 10 min après le stress	10 min après traitement à la PB	Nage forcée (2 fois 4 min) ou pattes dans l'eau glacée (5 min)	Aucun effet observé	(Grauer et al. 2000)
Rat Long-Evans ou Wistar	PB (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ou 5 mg/kg) <i>i.p.</i> 10 min après le stress	60 min après le stress	Nage forcée (2 fois 10 min) et/ou contention (30 min)	Pour chaque posologie de PB : activité AChE augmentée chez les animaux stressés	(Sinton et al. 2000)
Rat Sprague-Dawley	PB (1,5 mg/kg/jour), minipompes osmotiques pendant 4 jours	7 jours après la première administration de PB	Choc électrique plantaire intermittent toute la journée les 3 jours suivant la dernière injection de PB	Aucun effet observé : la PB ne majore pas les effets du stress sur les performances ni sur les taux d'hormones	(Kant et al. 2001)
Rat Sprague-Dawley	Traitement aigu : PB (30 mg/kg), <i>p.o.</i> Traitement chronique : PB (0,3 mg/kg/ jour) <i>p.o.</i> pendant 14 jours PB (10 mg/kg/jour) <i>p.o.</i> pendant 14 jours	1 h après le dernier traitement	Contention de 1 à 4 h (avant, après ou avant et après le traitement) Contention d'1 h juste après la prise de PB pendant 14 jours	Pas de modification de la BHE à la peroxydase Aucune influence des différentes formes de stress sur l'inhibition cholinérasique centrale ou périphérique	(Song et al. 2002)
Rat Sprague-Dawley	PB (1 mg/kg), <i>p.o.</i> 20 minutes avant et toutes les 2 heures après le début du stress	Juste après la fin du stress	Contention et immersion dans l'eau froide pendant 4 heures	Aucune inhibition de l'activité AChE cérébrale du cerveau entier	(Park et al. 2008)

**Tableau 3 :** tableau récapitulatif des différentes études ne démontrant aucun effet de la pyridostigmine au niveau du SNC, lorsqu'elle est combinée à un stress

## CHAPITRE II : Pyridostigmine et système cholinergique

Synthétisée pour la première fois en 1946 par R. Urban (Somani & Husain 2001), la pyridostigmine appartient à une classe de molécules appelées anticholinestérasiques. La molécule de pyridostigmine ou 3-(diméthylaminocarbonyloxy)-1-méthylpyridinium appartient à la famille des carbamates, composés porteurs d'une fonction N-(C=O)-O- (**figure 1**). Elle est administrée sous forme de sel appelé bromure de pyridostigmine ou PB. Elle possède en outre un ammonium quaternaire.



**Figure 1** : structure de la molécule de bromure de 3-(diméthylaminocarbonyloxy)-1-méthylpyridinium ou PB.

La PB se lie et inhibe de façon réversible l'AChE, enzyme responsable de la dégradation du neurotransmetteur acétylcholine (ACh). Elle potentialise ainsi les effets de ce neurotransmetteur localisé aussi bien au niveau du système nerveux central (SNC) que périphérique (SNP).

La présence d'un ammonium quaternaire rend la molécule polaire. Elle ne franchit donc pas la barrière hémato-encéphalique (BHE) et ne peut donc agir au niveau du SNC (Birtley et al. 1966; Dunn et al. 1997). N'agissant par conséquent qu'au niveau périphérique, la PB est un traitement de choix pour le traitement de la myasthénie acquise, maladie neuromusculaire auto-immune. Cette molécule (dont le nom de la spécialité est le Mestinon®) est utilisée depuis de nombreuses années pour le traitement de cette maladie. Pour cette indication, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de ce médicament date de janvier 1955 (AMM n°36166279).

Ces mêmes propriétés ont permis de choisir la PB comme traitement préventif en cas de risque d'intoxication aux neurotoxiques organophosphorés lors de conflits armés (Doctor et al. 2001). Pour cette indication, son AMM en France ne fut que récemment obtenue (29/01/2008) ; toutefois depuis 1986, l'Armée Américaine a autorisé son utilisation en tant que traitement prophylactique lors de conflits. La dose de 30 mg de PB administrée toutes les huit heures (Somani & Husain 2001) est recommandée aux soldats afin de les protéger contre une éventuelle intoxication par les neurotoxiques organophosphorés.

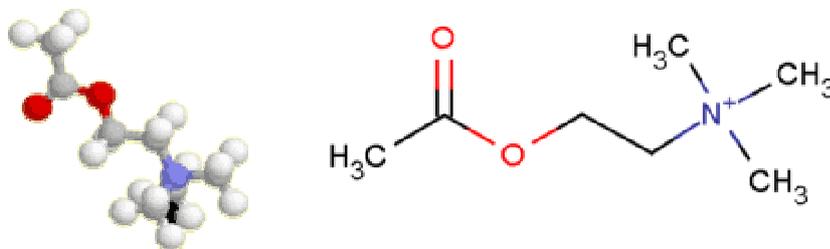
La PB étant un anticholinestérasique, nous décrirons, tout d'abord, le système cholinergique afin d'identifier les cibles potentielles de la PB. Puis nous présenterons les propriétés de la PB justifiant son utilisation pour le traitement de la myasthénie et en tant que traitement prophylactique lors des conflits armés. Pour finir, nous décrirons les principales données pharmacocinétiques de la PB ayant justifié son utilisation dans ces deux applications médicamenteuses.

## 1) Le système cholinergique

L'ACh est le premier neurotransmetteur à avoir été isolé à partir d'un champignon parasite cryptogame responsable de l'ergot de seigle. Cet ester de l'acide acétique et de la choline, dont l'action est médiée par les récepteurs nicotiniques et muscariniques, a une masse molaire de 146,2 g/mol et pour formule chimique  $C_7H_{16}NO_2$  (**figure 2**). Par la suite ses fonctions furent identifiées par Otto Loewi (1921) qui démontra pour la première fois que la transmission entre le nerf vague et le cœur se faisait grâce à un messager chimique capable de ralentir le rythme cardiaque. L'ACh a depuis été identifiée comme un neuromédiateur au sein de nombreuses synapses chez les invertébrés comme chez vertébrés.

Ce neurotransmetteur est présent au niveau du SNC, où il est impliqué dans la mémoire et l'apprentissage, et au niveau du SNP.

Au niveau des jonctions neuromusculaires, l'ACh, seul neurotransmetteur agissant sur des récepteurs localisés au niveau de la plaque motrice, est responsable de la contraction musculaire.



**Figure 2** : structure de l'acétylcholine (représentation tridimensionnelle et formule développée).

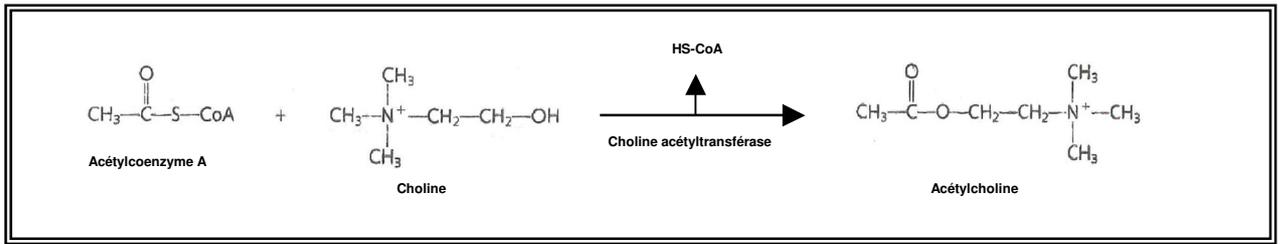
L'ACh, comme tout neurotransmetteur, est un messager chimique qui transmet l'influx nerveux en agissant au niveau de synapses. La transmission synaptique de type cholinergique peut être divisée en plusieurs étapes :

- La synthèse de l'ACh ;
- Le stockage de l'ACh ;
- L'excrétion ou la libération de l'ACh dans la fente synaptique ;
- La fixation de l'ACh sur ses récepteurs ;
- L'inactivation par dégradation de l'ACh par l'AChE.

### 1.1- Biosynthèse de l'acétylcholine (Racke et al. 2006)

La synthèse du neurotransmetteur se déroule au niveau du bouton terminal de l'axone à partir de précurseurs. L'action d'enzymes spécifiques permet la transformation des précurseurs en neurotransmetteurs actifs.

La synthèse d'ACh, réalisée dans le cytoplasme des neurones pré-synaptiques, est catalysée par la choline acétyltransférase. Cette enzyme utilise la choline et l'acétylcoenzyme A comme substrats (**figure 3**).



**Figure 3** : schéma de synthèse de l'acétylcholine

La choline acétyltransférase est synthétisée dans le corps cellulaire du neurone pré-synaptique avant d'être transportée jusqu'à l'extrémité de l'axone, lieu de synthèse du neurotransmetteur. Elle est spécifique des neurones cholinergiques.

L'acétylcoenzyme A provient du métabolisme du glucose dans la mitochondrie lors de la glycolyse. Le glucose y est dégradé en pyruvate, lui-même transformé en acétylcoenzyme A par la pyruvate déshydrogénase, une enzyme mitochondriale.

La choline provient pour moitié de la choline recaptée suite à l'hydrolyse de l'ACh par l'AChE dans la fente synaptique. Cette recapture est effectuée au niveau des terminaisons cholinergiques par un mécanisme de transport actif Na<sup>+</sup> dépendant (Racke et al. 2006). Cette capture est proportionnelle à la synthèse d'ACh et représente le facteur limitant de sa synthèse (Gyls & Jenden 1996). L'autre moitié provient des tissus et présente deux origines :

- une origine exogène, c'est-à-dire alimentaire. Le jaune d'œuf est de loin l'aliment le plus riche en choline. Viennent ensuite le foie, la viande et les poissons. Après absorption au niveau de l'intestin grêle, la choline est transportée jusqu'au foie puis distribuée dans les tissus.
- une origine endogène par biosynthèse à partir d'un acide aminé, la glycine lors de la dégradation des phospholipides membranaires. La glycine est successivement transformée en sérine, éthanolamine, phosphatidyl-éthanolamine. Cette dernière subit trois méthylation pour aboutir à la phosphatidylcholine puis à la choline. La triméthylation de la phosphatidyl-éthanolamine dépend de la présence de vitamine B12, d'acide folique et de méthionine.

### **1.2- Stockage de l'acétylcholine**

L'ACh synthétisée dans le cytoplasme des terminaisons axonales est accumulée dans des vésicules synaptiques. Ces vésicules sont préalablement formées au niveau de puits à clathrine de la membrane de l'axone. Le transport au sein des vésicules se fait grâce à des transporteurs présents à la surface des membranes des vésicules, les vesicular-acetylcholin-transporters (VAcHT). Ces transporteurs fonctionnent en utilisant l'énergie d'un gradient de protons, établi par le transport actif d'ions H<sup>+</sup>, du cytoplasme vers l'intérieur des vésicules par une pompe H<sup>+</sup>/ATPase (Anderson et al. 1982; Parsons 2000). Ces vésicules

ayant incorporé l'ACh sont ensuite attachées à des éléments du cytosquelette près de l'endroit où elles fusionneront avec la membrane.

Dans les terminaisons axonales, l'ACh est présente dans les vésicules et dans le cytoplasme, ces deux compartiments étant en équilibre l'un avec l'autre.

### **1.3- Libération de l'ACh (revue Racke et al. 2006)**

L'ACh libérée provient majoritairement du compartiment vésiculaire bien que ce neurotransmetteur puisse également être libéré à partir du compartiment cytoplasmique.

La dépolarisation de la cellule, induite par l'arrivée des potentiels d'action, entraîne l'ouverture de canaux calciques « voltage-dépendants » engendrant une vague calcique cytosolique. Cet influx calcique permet la migration et la fusion des vésicules avec la membrane et aboutit à l'exocytose de l'ACh dans la fente synaptique (Katz & Miledi 1967).

La libération de l'ACh peut également être modulée par d'autres systèmes. Des récepteurs cholinergiques (appelés autorécepteurs) sont en effet présents sur la membrane de l'extrémité axonale du neurone pré-synaptique. La fixation de l'ACh libérée sur ces récepteurs freine la libération d'ACh. Il existe également un rétrocontrôle par le biais d'autres neurotransmetteurs se fixant sur leurs récepteurs situés à la surface des neurones cholinergiques. Ces neurotransmetteurs qui ont un effet inhibiteur sur la sécrétion d'ACh sont la dopamine, la noradrénaline, la sérotonine et l'acide gamma aminobutyrique (GABA).

Une fois libérée, l'ACh peut interagir avec ses récepteurs spécifiques communiquant ainsi une information aux neurones post-synaptiques. Elle peut également subir une hydrolyse rapide par l'AChE présente dans la fente synaptique.

### **1.4- Fixation de l'ACh sur ses récepteurs**

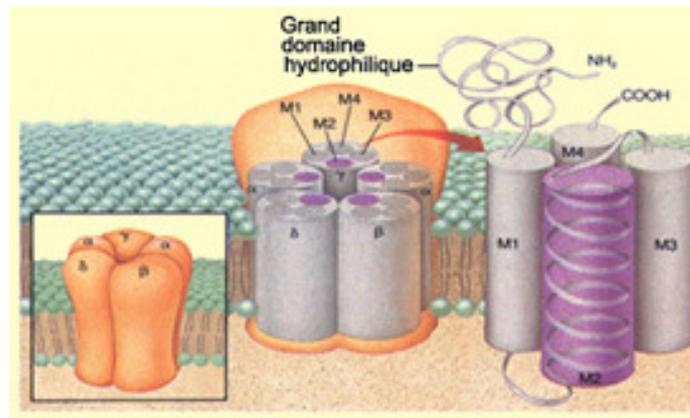
Deux types de récepteurs ont été identifiés. En fonction de leur sélectivité pour leur agoniste spécifique, la nicotine et la muscarine, ces deux types de récepteurs ont été appelés récepteurs nicotiniques et muscariniques. Même s'ils sont parfois présents au niveau d'une même synapse (synapse entre le neurone connecteur et le neurone effecteur du système nerveux végétatif) (Fossier et al. 1988), ces deux types de récepteurs sont le plus souvent indépendants l'un de l'autre. De plus, ils diffèrent de par leur localisation, leur structure, leurs propriétés pharmacologiques ainsi que leur temps de réponse.

#### **1.4.1 - Les récepteurs nicotiniques (Racke et al. 2006)**

Les actions rapides de l'ACh sont médiées via son interaction avec les récepteurs nicotiniques, premiers récepteurs cholinergiques identifiés. Ce sont des récepteurs ionotropes, aussi appelés « récepteurs canaux ». Ils sont majoritairement perméables au Na<sup>+</sup> et au K<sup>+</sup> mais laissent aussi entrer du Ca<sup>2+</sup> en même temps que du Na<sup>+</sup>. Les cations diffusent en fonction de leur gradient de concentration. La réponse à la stimulation des récepteurs nicotiniques est rapide et de courte durée.

### Structure

Les récepteurs nicotiques sont constitués de 5 sous-unités arrangées de façon à former un canal ionique central (diamètre 6,5Å). Ces protéines pentamériques sont insérées dans la bicouche lipidique de la membrane post-synaptique (**figure 4**). La même protéine forme le canal transmembranaire et fixe l'ACh. Chaque sous-unité comprend elle-même quatre domaines hélicoïdaux transmembranaires identifiés M1 à M4. Dans chaque sous-unité c'est la partie M2 de ces hélices qui forme la paroi du canal ionique du récepteur. Chaque sous-unité comprend également une longue région extracellulaire formant le site de liaison de l'ACh.



**Figure 4** : représentation schématique de la structure d'un récepteur nicotique incrusté dans la bicouche lipidique (d'après « le cerveau à tous les niveaux », <http://lecerveau.mcgill.ca>).

### Les différents types de récepteurs nicotiques et leur mode d'action

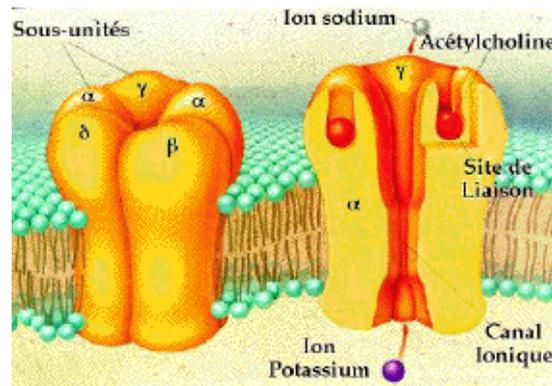
En fonction de leur composition en sous-unités, on distingue différents isotopes de récepteur nicotique qui présentent une activation, une cinétique d'inhibition ainsi que des propriétés pharmacologiques différentes (Galzi & Changeux 1995; Sgard et al. 2002).

Le récepteur nicotique est toujours formé de deux sous-unités  $\alpha$  qui ne sont jamais adjacentes et constituent un site de liaison pour l'ACh et d'autres ligands tels que la nicotine et l' $\alpha$ -bungarotoxine. Les 3 sous-unités restantes permettent de distinguer les récepteurs de la jonction neuromusculaire et les récepteurs nicotiques neuronaux.

Au niveau de la jonction neuromusculaire, les deux sous-unités  $\alpha$  s'associent à quatre autres types de sous-unités ( $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $\epsilon$ ). Les proportions  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ou  $2\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  permettent respectivement de distinguer les récepteurs musculaires embryonnaires et les récepteurs adultes.

Les récepteurs nicotiques neuronaux diffèrent de ceux des muscles parcequ'ils sont uniquement composés de 2 types de sous-unités,  $\alpha$  ou  $\beta$ . Le plus souvent ces récepteurs sont constitués de 3 sous-unités  $\alpha$  et 2  $\beta$ .

L'activation des deux sites  $\alpha$  est nécessaire à l'ouverture du canal. Lorsque aucun neurotransmetteur n'est fixé au récepteur, le pore est fermé. La fixation de deux molécules d'ACh sur la partie extracellulaire des sous-unités  $\alpha$  induit un changement de conformation allostérique du canal provoquant son ouverture (**figure 5**). La durée de l'ouverture dépend de l'affinité et de la concentration de l'agoniste. L'ouverture du canal favorise un influx sodique et potassique responsable de la dépolarisation de la membrane post-synaptique (Jones & Dunlop 2007).



**Figure 5** : schéma du mode de fonctionnement d'un récepteur nicotinique (d'après bioorga.u-strasbg.fr).

### Localisation et fonctions

Les récepteurs nicotiniques sont principalement localisés au niveau du SNP et du SNC.

Dans le système nerveux autonome, ils sont présents au niveau des ganglions sympathiques et parasympathiques. Ce sont les récepteurs exclusifs de la plaque motrice des muscles squelettiques. Leur stimulation entraîne la contraction musculaire. Ils se trouvent également sur les cellules productrices d'hormones et les glandes surrénales.

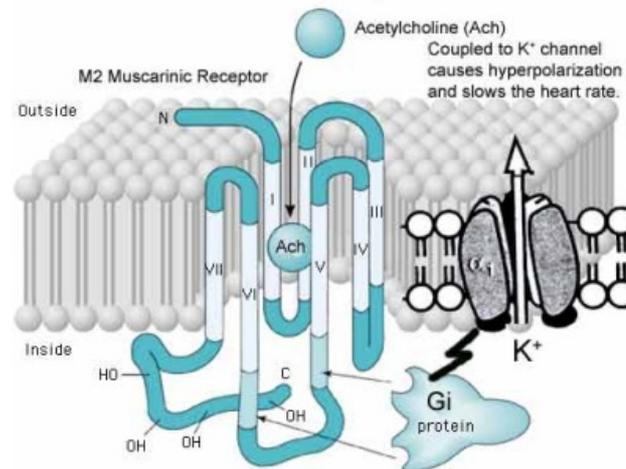
Au niveau du SNC, les récepteurs nicotiniques représentent 5% de l'ensemble des récepteurs cholinergiques. Leur structure hétérogène permet l'implication de ces récepteurs dans de nombreuses fonctions telles que le maintien de l'éveil (Marrosu et al. 1995), l'apprentissage et la mémorisation (Butt et al. 1997).

#### 1.4.2 - Les récepteurs muscariniques

Ils représentent le deuxième type de récepteurs pouvant lier l'ACh. La réponse de ces récepteurs est plus lente et présente une durée d'action plus longue que celle des récepteurs nicotiniques. Les récepteurs muscariniques appartiennent aux récepteurs métabotropes, c'est à dire couplés aux protéines G (RCPG), qui constituent la plus grande famille de récepteurs membranaires de mammifères puisqu'elle représente 3,4% du génome (Bockaert & Pin 1999).

### Structure

Ces récepteurs se caractérisent par une structure à 7 domaines transmembranaires constitués d'acides aminés hydrophobes. Les 7 hélices transmembranaires des récepteurs muscariniques proviennent de la même protéine qui serpente à travers la membrane formant ainsi trois boucles et une extrémité C-terminale intracellulaires (**figure 6**).



**Figure 6** : schéma de la structure d'un récepteur muscarinique (d'après [pharmacy.wsu.edu/courses](http://pharmacy.wsu.edu/courses))

### Les différents types de récepteurs muscariniques et leur mode d'action

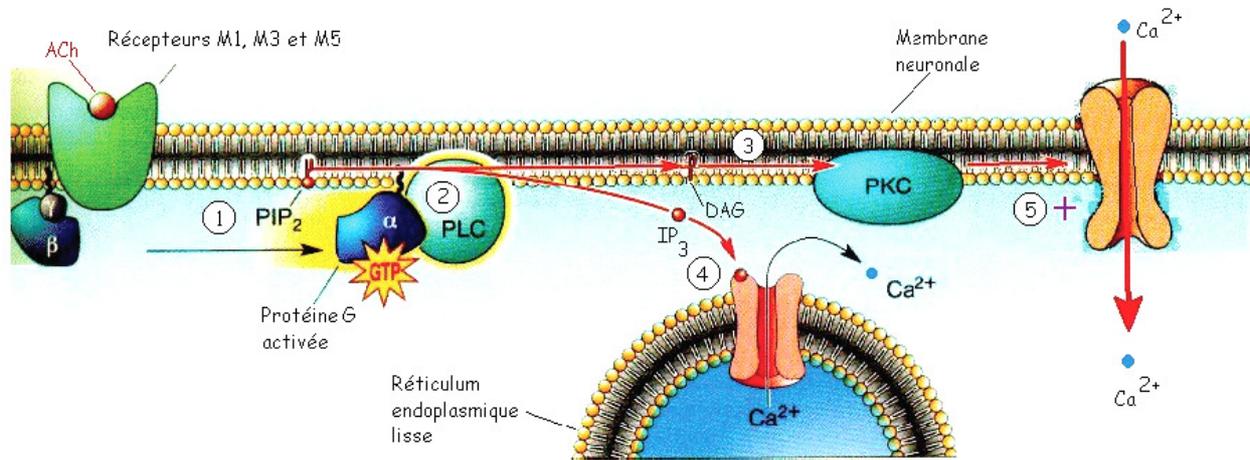
Les récepteurs métabotropes diffèrent des récepteurs ionotropes car ils exercent leurs effets sur les canaux via une protéine située du côté cytoplasmique. Cette protéine, appelée protéine G, est formée de trois sous-unités protéiques ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). La sous-unité  $\alpha$  se lie aux nucléotides dérivés de la guanine [guanosine di-phosphate (GDP) et guanosine tri-phosphate (GTP)]. Deux conformations fonctionnelles peuvent être distinguées : la protéine G liée au GDP ou au GTP. Quand le GDP est lié à la sous-unité  $\alpha$ , il y a formation d'un trimère inactif. Quand c'est le GTP qui est lié à la sous-unité  $\alpha$ , celle-ci se dissocie du complexe formé par les 2 autres sous-unités.

La liaison de l'ACh sur son récepteur provoque deux changements conformationnels : tout d'abord celui du récepteur lié à l'ACh, entraînant lui-même un changement de conformation de la protéine G. Le site des « dérivés de la guanine » de la protéine G s'ouvre, libérant alors le GDP et rendant possible la mise en place du GTP à ce même niveau. La sous-unité  $G\alpha$  liée au GTP se dissocie des autres sous-unités et peut alors activer différentes protéines dites « effectrices ». L'action des récepteurs muscariniques est par conséquent moins rapide que celle des récepteurs nicotiniques.

On distingue 5 types de récepteurs muscariniques ( $M_1$  à  $M_5$ ) codés par 5 gènes distincts (Caulfield & Birdsall 1998). Les 5 types de récepteurs muscariniques peuvent fixer la muscarine comme agoniste et l'atropine comme antagoniste. Bien que tous ces types de récepteurs agissent via l'activation d'une protéine G, la réponse sera différente qu'il s'agisse des récepteurs  $M_1$ ,  $M_3$  et  $M_5$  ou  $M_2$  et  $M_4$ .

*Mode d'action des récepteurs M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub>*

Ils sont tous trois couplés à une protéine Gs (stimulatrice). La liaison de l'ACh au récepteur active la protéine Gs. La sous-unité  $\alpha$  liant le GTP se détache alors de la protéine G et peut activer d'une part l'adénylate cyclase et d'autre part la phospholipase C (**figure 7**).



**Figure 7** : mécanisme d'action des récepteurs M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub> (d'après Neurosciences édition De Boeck Université).

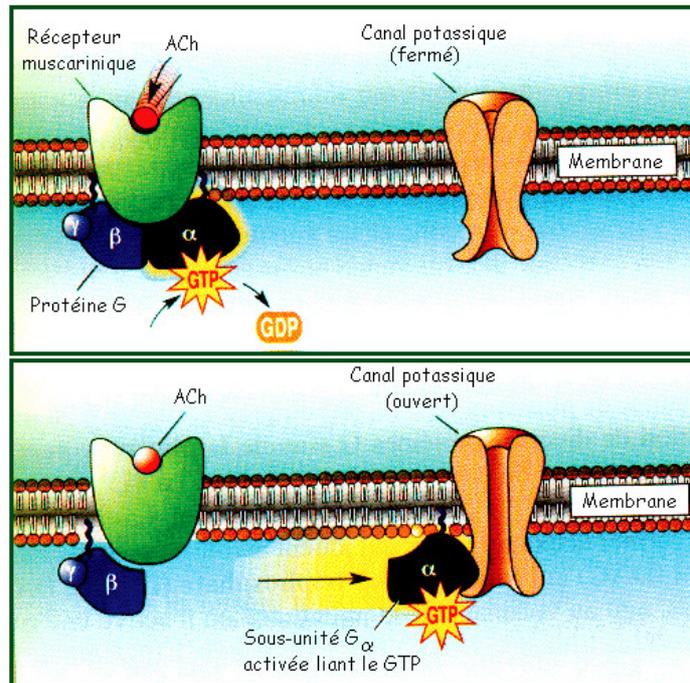
L'adénylate cyclase est une enzyme membranaire qui transforme l'ATP en AMPc. L'élévation du taux d'AMPc dans le cytoplasme active la protéine kinase A alors capable de phosphoryler des canaux potassiques membranaires, les rendant inactifs.

La phospholipase C est également une enzyme membranaire dégradant le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) en deux molécules qui vont jouer le rôle de seconds messagers : le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG, lipophile, agit au sein de la membrane où il active la protéine kinase C qui va phosphoryler les canaux calciques. Une fois activés, ces derniers permettent un influx calcique (Jones & Dunlop 2007). L'élévation de la concentration intracellulaire en calcium est également due à l'action de l'IP<sub>3</sub>. Ce composé, hydrophile, diffuse plus loin dans le cytosol et se fixe sur des récepteurs spécifiques du réticulum endoplasmique lisse, provoquant une libération de calcium vers le cytosol.

En empêchant la sortie de potassium et en augmentant les taux intracellulaires de calcium, ces phénomènes induisent une dépolarisation du neurone ; ils ont donc un effet excitateur.

*Mode d'action des récepteurs M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub>*

Un mode d'action différent est associé aux types M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub> présentant une activité inhibitrice car couplés à une protéine Gi (Felder 1995; Caulfield & Birdsall 1998) (**Figure 8**). La fixation de l'ACh au récepteur stimule la protéine Gi, inhibitrice de l'adénylate cyclase. La formation d'AMPc s'en trouve en conséquence inhibée. Cette baisse de la quantité de second messager conduit à l'ouverture de canaux potassiques se traduisant par une hyperpolarisation de la cellule. Ces récepteurs ont donc une activité inhibitrice.



**Figure 8** : mécanisme d'action des récepteurs M<sub>2</sub> et M<sub>4</sub> (d'après Neurosciences édition De Boeck Université).

### Localisation

Les récepteurs muscariniques sont essentiellement présents au niveau du SNC où ils représentent 95% des récepteurs cholinergiques. Ils sont distribués de manière variable suivant la structure cérébrale étudiée (Yamamura et al. 1974). Ils sont abondants dans les structures striatales et corticales (Perry et al. 1989), le noyau caudé, l'hippocampe (structure dans laquelle se trouve 50% des récepteurs muscariniques centraux), le noyau ventro-basal du thalamus, le cortex piriforme, le cortex cérébelleux et la moelle épinière. Leur répartition varie également en fonction de leur nature. Une plus grande proportion de récepteurs M<sub>1</sub> est retrouvée dans l'hippocampe alors que le cervelet et l'hypothalamus contiennent de nombreux récepteurs M<sub>2</sub> (Giraldo et al. 1987). Les récepteurs de type M<sub>4</sub> sont quant à eux fortement exprimés au niveau du striatum chez le Rat (Smythies 2005). Enfin les récepteurs M<sub>3</sub> et M<sub>5</sub> présentent une distribution ubiquitaire au niveau cérébral.

On trouve également des récepteurs muscariniques dans le système nerveux autonome essentiellement au niveau des poumons, du cœur, des ganglions parasympathiques et des muscles lisses.

### **1.5- Distribution et effets biologiques de l'ACh**

Les transmissions cholinergiques participent à de nombreuses fonctions, aussi bien au niveau central que périphérique.

Au niveau du système autonome, l'ACh est le médiateur des neurones pré-ganglionnaires des systèmes sympathique et parasympathique ainsi qu'au niveau des neurones post-ganglionnaires du système

parasymphatique. Les principales cibles de l'ACh sont les organes innervés par le système autonome : l'œil, le cœur, les glandes salivaires et lacrymales, les bronches, le tractus digestif... Cependant son rôle varie d'un organe à l'autre.

Au niveau de la jonction neuromusculaire, l'ACh est le seul neurotransmetteur présent et transmet l'influx nerveux des nerfs moteurs aux fibres musculaires, entraînant la contraction des muscles.

Au niveau du SNC, l'ACh est notamment distribuée au niveau de certaines synapses du noyau basilaire et du noyau caudé. Les rôles respectifs des récepteurs nicotiques et muscariniques y sont encore mal connus. Certaines fonctions impliquant ces récepteurs sont présentées dans le **tableau 4**.

<b>Tissu</b>	<b>Effets de l'ACh</b>	<b>Récepteurs impliqués</b>
Système nerveux central	Mémorisation, apprentissage, hypothermie, tremblements	M <sub>1</sub>
Cœur	Bradycardie	M <sub>2</sub>
Vaisseaux	Vasodilatation, baisse de la pression artérielle	M <sub>3</sub>
Poumon	Contraction des bronches, sécrétion	M <sub>3</sub>
Intestin, estomac	Contractions, sécrétions	M <sub>3</sub>
Glandes salivaires	Sécrétions	M <sub>3</sub>
Œil	Contraction des pupilles, larmes	M <sub>3</sub>
Muscle squelettique	Contraction	Nicotinique
Jonction neuromusculaire	Transmission neuromusculaire	Nicotinique
Glande médullosurrénale	Libération d'adrénaline	Nicotinique
SN sympathique	Libération de noradrénaline	Nicotinique

**Tableau 4** : effets de l'acétylcholine au niveau du SNC et du SNP.

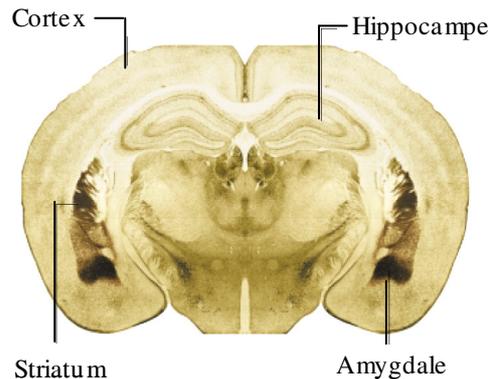
### **1.6- Catabolisme de l'ACh (Rand 2007)**

Contrairement à de nombreux neuromédiateurs qui sont recapturés par le bouton terminal du neurone pré-synaptique (dopamine, sérotonine, adrénaline), l'ACh libérée après exocytose est rapidement dégradée en choline et en acide acétique par l'AChE présente dans la fente synaptique. Après hydrolyse de l'ACh, 50% de la choline libérée est recapturée par la terminaison pré-synaptique afin de participer à nouveau à la synthèse d'ACh.

### 1.6.1 - Structure et localisation de l'AChE

L'AChE est une enzyme de type estérase qui fait partie des protéases à sérine. C'est une enzyme polymorphe pouvant comporter de 1 à 12 sous-unités catalytiques. Synthétisée dans le corps cellulaire des neurones, l'enzyme est principalement située à la surface de la terminaison post-synaptique.

L'AChE est largement distribuée, on la trouve dans le SNC (**figure 9**), dans le SNP ainsi qu'à la surface des globules rouges.



**Figure 9** : distribution de l'activité AChE au niveau du cerveau de souris (d'après Soreq & Seidman 2001). On constate une forte activité enzymatique au niveau de l'amygdale et du caudate putamen (striatum). Cette activité est également détectable au niveau du cortex et de l'hippocampe.

### 1.6.2 - Propriétés catalytiques de l'AChE

L'AChE fait partie des enzymes présentant une activité catalytique des plus rapides. La dégradation d'une molécule d'ACh se fait en 80 ms environ. L'action rapide de ces enzymes est indispensable pour limiter l'activation des récepteurs nicotiniques comme muscariniques (Jones & Dunlop 2007) et permettre une transmission cholinergique correcte.

Chez les vertébrés, on distingue deux types de cholinestérases. L'acétylcholinestérase (AChE) est principalement présente dans le tissu nerveux et les globules rouges et possède comme substrat principal l'ACh. La butyrylcholinestérase (BuChE) est présente dans d'autres tissus tels que le cœur mais aussi dans le plasma. Ses substrats sont aussi bien l'ACh que la butyrylcholine. Il est cependant à noter qu'elle ne représente qu'une faible proportion de l'activité totale de la dégradation de ce neurotransmetteur.

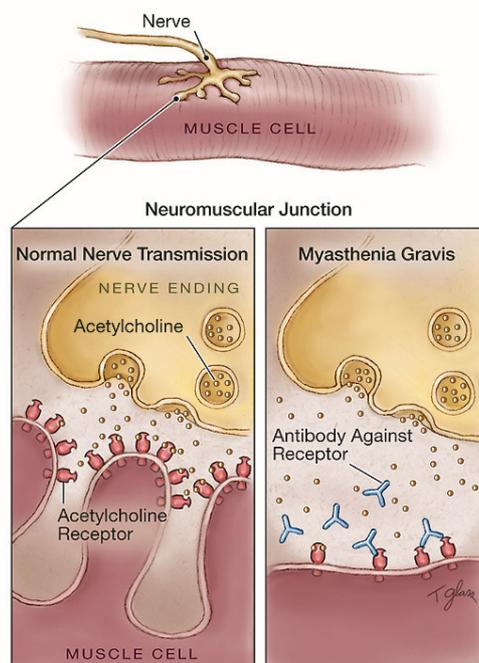
L'AChE est la cible de nombreux inhibiteurs réversibles ou irréversibles. Son inhibition conduit à une augmentation de la concentration en ACh, une augmentation du temps d'action du neurotransmetteur sur ses récepteurs et donc à une augmentation de la réponse cholinergique. Du fait de leur mode d'action, les anticholinestérasiques réversibles constituent des molécules de choix pour le traitement de certaines maladies impliquant le système cholinergique. Les inhibiteurs réversibles sont utilisés dans le traitement de maladies, telle que la maladie d'Alzheimer où leur emploi conduit à une amélioration des performances

mnésiques et cognitives. La molécule de bromure de pyridostigmine, anticholinestérasique réversible, est comme précisé précédemment utilisée pour le traitement de la myasthénie acquise. Les inhibiteurs irréversibles constituent quant à eux de redoutables neurotoxiques pouvant par exemple être utilisés dans la vie quotidienne en tant qu'insecticides mais aussi de manière prohibée comme armes de guerre. Il est en effet à noter que l'emploi d'armes chimiques lors de conflits est interdit par la Convention de Genève de 1925 (pour les gaz) et par la Convention d'Interdiction d'utilisation des Armes Chimiques (CIAC) signée en 1994.

## 2) PB et myasthénie

### 2.1- Description de la maladie

La myasthénie est une maladie caractérisée par un défaut de la transmission de l'influx nerveux entre le nerf et le muscle. Décrite par T. Willis en 1685, elle est caractérisée par un épuisement de la force musculaire, particulièrement à la suite d'une activation prolongée. Son origine est encore inconnue mais cette maladie, dite auto-immune, résulte de l'altération des récepteurs de l'ACh situés sur la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire (**figure 10**) (Chan & Ho 2002). Les anticorps produits attaquent les récepteurs du soi qui perdent ainsi leurs fonctions. La perte des récepteurs cholinergiques se traduit par une diminution de l'activité cholinergique et une transmission neuromusculaire plus faible (Goulon-Goean & Gajdos 2002).



**Figure 10** : physiopathologie de la jonction neuromusculaire au cours de la myasthénie (d'après Torpy et al. 2005)

Chez les sujets myasthéniques, la microscopie électronique a mis en évidence des anomalies morphologiques de la jonction neuromusculaire consistant en un élargissement de la fente synaptique, un effacement des replis de la membrane post-synaptique et une réduction de la densité en récepteurs cholinergiques.

### **2.2- Prévalence**

La prévalence de cette maladie est rare (5 individus sur 100 000) (Engel 1984). Elle atteint les deux sexes et peut débuter à n'importe quel âge. La myasthénie présente deux pics de fréquence : les femmes développent cette maladie avant 35 ans alors que les hommes sont touchés entre 60 et 74 ans (Drachman 1994; Antonini et al. 1996).

### **2.3- Traitement de la myasthénie**

Chez les personnes myasthéniques, la faiblesse musculaire peut être améliorée après traitement par les inhibiteurs de l'AChE. En effet, les anticholinestérasiques augmentent la quantité d'ACh disponible pour se lier aux récepteurs restants (Drachman 1994). Cette augmentation de la concentration en ACh permet de restaurer une partie de l'activité cholinergique et induit une activation plus efficace des récepteurs post-synaptiques que le système immunitaire n'a pas encore détruits (Patrick & Lindstrom 1973).

Le bromure de pyridostigmine (dont le nom de spécialité est le Mestinon<sup>®</sup>) présente un effet maximal en 60 à 90 minutes et dure de 3 à 4 heures. Dans le cadre du traitement de la myasthénie, la posologie recommandée varie entre 240 et 480 mg de PB par jour selon la gravité de la maladie. Cette dose journalière peut être administrée en 3 ou 4 prises selon le Vidal<sup>®</sup>.

### **2.4- Effets secondaires liés au traitement de la myasthénie**

Bien que la PB soit utilisée depuis de nombreuses années pour le traitement de la myasthénie, la tolérance de la molécule chez les patients a été très peu étudiée après sa mise sur le marché. Depuis 1990, seules deux études rétrospectives ont évalué les effets secondaires consécutifs à un traitement par la PB chez des patients myasthéniques.

La posologie recommandée étant différente selon la gravité de la maladie, la dose seuil pour l'apparition des effets secondaires est variable d'un patient à l'autre. Les effets secondaires du Mestinon<sup>®</sup> sont essentiellement liés à l'accumulation d'ACh au niveau des récepteurs muscariniques sur les synapses cholinergiques des muscles lisses et au niveau des récepteurs nicotiniques des muscles squelettiques (Hood 1990; Beekman et al. 1997). Les effets secondaires muscariniques gastro-intestinaux associent douleur, crampes abdominales, diarrhées, nausées et vomissements. L'action de l'ACh au niveau des récepteurs nicotiniques induit des crampes musculaires, des fasciculations ainsi qu'une faiblesse musculaire.

Depuis quelques années, une nouvelle cible thérapeutique existe pour la PB. En effet, les neurotoxiques organophosphorés sont des anticholinestérasiques irréversibles représentant une menace lors

des conflits armés ou d'actes de terrorisme. Le mode d'action de la PB en a fait un candidat de choix pour parer à une éventuelle intoxication par ces agents.

### **3) Traitement prophylactique par la PB**

#### **3.1- Définition des neurotoxiques organophosphorés (pour revue, Marrs 2007)**

En 1936, le chimiste allemand Schrader fut le premier à synthétiser le tabun. Suivirent le sarin, le soman et le VX respectivement synthétisés en 1938, 1944 et 1945 (Somani & Husain 2001). Du fait de leurs propriétés incolore et inodore, du faible coût de leur synthèse et de leur mode d'action, ces agents furent utilisés en tant qu'armes chimiques.

Les NOPs sont des esters synthétiques de l'acide phosphonique parmi lesquels on distingue les agents G (tabun, sarin ou soman) et les agents V dont le VX.

Les agents G sont des esters des acides fluorophosphonique et cyan-phosphonique. Ce sont des liquides, le plus souvent inodores et incolores. De par leur propriété volatile, ces agents sont dits « non-persistants » ; ils s'évaporent et se dispersent après quelques heures. Ils sont dispersés sous forme d'aérosols et peuvent agir par voie respiratoire. Ils pénètrent également facilement la peau et les muqueuses. Le plus dangereux est le soman. En effet, le complexe soman-AChE subit une déalkylation secondaire rapide rendant impossible la réactivation. Ce phénomène extrêmement rapide est appelé vieillissement ou « aging » et sera décrit ultérieurement dans ce manuscrit.

Le VX est un ester de l'acide thio-phosphonique. C'est un liquide très peu volatile dont le danger est lié à une pénétration par voie percutanée. Le VX est dit « persistant », il présente une plus grande résistance à son hydrolyse que les agents G et peut ainsi contaminer plus longuement les milieux.

#### **3.2- Mode d'action des neurotoxiques (pour revue, Marrs 2007)**

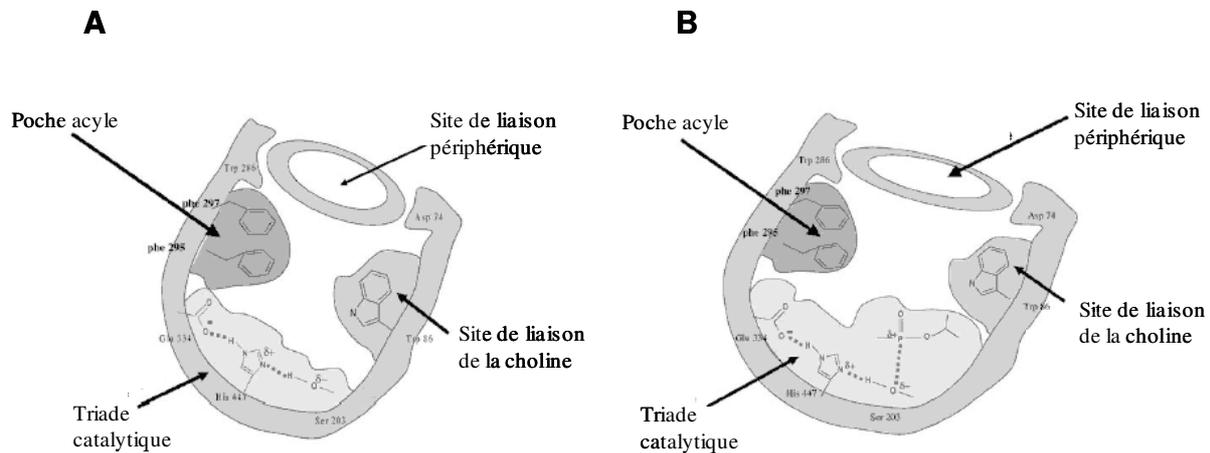
##### **3.2.1 - Action sur la synapse cholinergique**

Le mécanisme d'action principal des NOPs consiste à bloquer la dégradation de l'ACh au niveau des synapses cholinergiques par inhibition irréversible des cholinestérases (Sidell & Borak 1992).

Les NOPs réagissent avec l'AChE du sang (Benschop & De Jong 2001) puis au niveau de leurs tissus cibles du SNC et du SNP (Bajgar 1991; Bardin et al. 1994). Ces composés étant particulièrement lipophiles, ils franchissent aisément toutes les barrières biologiques. Au niveau du SNC, même si une faible quantité de NOPs franchit la BHE, elle suffit pour inhiber la totalité de l'activité cholinestérasique cérébrale (Blanchet et al. 1991).

L'activité anti-cholinestérasique des NOPs est due à la formation d'un complexe covalent particulièrement stable et résistant à l'hydrolyse. L'AChE contient un site actif composé d'une triade catalytique (Glu<sup>334</sup>-His<sup>447</sup>-Ser<sup>203</sup>) appelé site estérasique (**figure 11 A**). Grâce à leur radical phosphate, les NOPs se lient au site estérasique et phosphorylent le groupement hydroxyle de la sérine présente au niveau de la triade catalytique (**figure 11 B**). La liaison des NOPs à l'AChE étant très stable, aucune restauration

spontanée de l'activité cholinestérasique ne peut se produire. Pour cette raison, la liaison est qualifiée d'**irréversible** et peut seulement être détruite en présence d'oximes. Ces molécules sont responsables d'une série de réactions permettant la séparation du NOP et de l'enzyme, processus appelé « réactivation ou régénération » (Madsen et al. 2003). Cette réactivation consiste en un décrochement du groupement phosphoryle situé au niveau du site actif de l'AChE.



**Figure 11** : A- Schéma de la structure de l'acétylcholinestérase des mammifères. Des études par rayons X ont identifié un site actif situé au fond d'une gorge d'environ 20 Å de profondeur. Ce site contient une triade catalytique, une poche acyle constituée de résidus phénylalanine, un site de liaison pour la choline et un site de liaison périphérique (d'après Abou-Donia 2003).

B- Schéma de l'enzyme AChE inhibée par un organophosphate (le sarin). L'inhibition est due à la phosphorylation du groupement hydroxyle de la sérine présente au niveau de la triade catalytique (d'après (Abou-Donia, 2003).

### 3.2.2 - Autres modes d'action des NOPs

Même si les principaux effets des NOPs résultent de leur action anticholinestérasique, ces composés peuvent également se lier à d'autres enzymes et ainsi moduler la transmission synaptique de différents systèmes. Ils ont également la faculté d'interagir avec les récepteurs cholinergiques.

Outre l'AChE, les NOPs peuvent se lier à des estérases telles que des sérines peptidases, des amidases, des protéases... L'inhibition d'au moins 70% des neuropathy-target-esterases (NTE) par les NOPs se traduit par une neuropathie retardée, maladie caractérisée par une dégénérescence de la gaine de myéline des axones des nerfs périphériques ainsi que de la moelle épinière (Costa 1997). Cette maladie survient généralement entre une et trois semaines après une intoxication aiguë importante (Keifer & Mahurin 1997).

La liaison des NOPs avec différents types d'enzymes conduit à la modulation des systèmes GABAergique, dopaminergique, glutamatergique et noradrénergique. Bien que cette modulation soit la conséquence d'un effet sur le système cholinergique, l'action des NOPs sur ces différents systèmes explique en partie les effets secondaires associés à ces composés.

Enfin, les NOPs peuvent agir de façon directe sur les récepteurs cholinergiques. Le VX, à des doses n'affectant pas l'activité cholinestérasique, interagit directement sur les récepteurs muscariniques pré-synaptiques induisant une inhibition de la libération du GABA. Les NOPs peuvent également interagir avec le récepteur M<sub>2</sub> cardiaque entraînant une toxicité dont la cause est encore inconnue (Sidell & Borak 1992).

### **3.3- Toxicité liée aux NOPs**

N'étant plus hydrolysée, l'ACh est capable d'agir pendant une longue période sur ses récepteurs de type nicotinique et muscarinique. Exacerbant ainsi les effets de ces récepteurs, une intoxication par les NOPs induit rapidement une crise cholinergique (Dunn & Sidell 1989; Rousseau et al. 2000; Madsen et al. 2003). Celle-ci associe différents syndromes :

- le syndrome muscarinique qui fait suite à une hypersécrétion et à la contraction des muscles lisses. Il associe des signes oculaires avec myosis, des signes respiratoires avec hypersécrétion lacrymale, nasale et bronchique, des signes digestifs avec spasmes gastro-intestinaux, coliques, nausées, vomissements et des signes cardiovasculaires avec hypotension artérielle, bradycardie puis arrêt cardiaque.

- le syndrome nicotinique, principalement dû à la contraction des muscles striés. Il associe des crampes puis un affaiblissement croissant par atteinte de la plaque motrice évoluant vers la paralysie des muscles striés et l'arrêt respiratoire.

- enfin le syndrome central associe des troubles du comportement avec ataxie et des crises convulsives.

L'intoxication suite à une exposition aux NOPs peut rapidement conduire à des crises d'épilepsies suivies de dommages cérébraux. Les anglais furent les premiers, dans les années 1970, à déterminer les caractéristiques d'un antidote permettant de contrer cette intoxication (Layish et al. 2005).

### **3.4- Antidote lors d'une intoxication aux NOPs**

Le principal antidote après une intoxication aux NOPs combine trois molécules complémentaires : l'atropine, un antagoniste muscarinique de l'ACh (qui ne se lie pas aux récepteurs nicotiniques), une oxime (pralidoxime, 2-PAM) pour réactiver l'AChE inhibée en favorisant la dissociation de l'agent fixé sur l'AChE, et du diazépam (benzodiazépine) pour traiter les convulsions et prévenir les éventuels effets centraux (Sidell 1997).

Les oximes sont des réactivateurs de cholinestérases hydrolysant non seulement la liaison NOP-AChE mais également le neurotoxique organophosphoré. Après liaison au niveau du site catalytique de l'enzyme puis au NOP, elles permettent la libération de l'AChE. Ce processus de réactivation de l'AChE par l'oxime n'est possible qu'au début de la liaison NOP-AChE. Dès lors que la déalkylation a eu lieu, les oximes ne sont plus efficaces. En effet, ce phénomène se traduit par **l'inactivation permanente et non réversible** de l'enzyme.

La déalkylation du complexe NOP-AChE inactive de façon permanente l'enzyme qui reste phosphorylée et donc inactive (Dunn & Sidell 1989). Plus précisément, on assiste à la perte du groupement

alkyle de la sérine situé au niveau de la triade catalytique (Curtil & Masson 1993). Ce processus rend la liaison avec le neurotoxique irréversible et seule la synthèse de nouvelles cholinestérases pourra permettre d'hydrolyser l'ACh. Le temps nécessaire pour que le phénomène d'« aging » se produise varie selon l'agent toxique employé (Talbot et al. 1988) ; il est de 48 heures pour le VX, varie de quelques minutes à quelques heures pour le tabun et est approximativement de 5 heures pour le sarin (Talbot et al. 1988; Bajgar 1991). Ce phénomène est beaucoup plus rapide pour le soman puisque seulement 2 minutes sont nécessaires pour que 50% du complexe enzyme/soman subissent le phénomène d'« aging ».

L'« aging » étant extrêmement rapide lors d'une intoxication au soman, la fenêtre d'action des soldats pour réagir après une exposition à un neurotoxique est très faible. Ils ont ainsi très peu de temps pour prendre l'oxime ; et celle-ci même administrée très rapidement après intoxication par ce composé ne serait plus efficace (Gunderson et al. 1992; Rosenbloom et al. 2002; Madsen et al. 2003). Pour contrer cet effet, la PB a été proposée comme traitement prophylactique. En effet cette molécule, suite à sa liaison avec l'AChE, la protège d'une interaction éventuelle avec le soman par un phénomène de compétition au niveau du site de liaison. De ce fait, la PB limite l'intoxication (Bajgar 2004).

Le pré-traitement à la PB trouve un intérêt lors d'intoxication au soman seul. En effet, l'antidote composé des 3 agents (oxime, atropine, diazepam) est suffisant pour une protection contre le tabun, le sarin et le VX puisque le complexe NOP-AChE présente dans ces cas un phénomène d'« aging » lent. Le pré-traitement à la PB combiné à l'atropine et à l'oxime permet de réduire la mortalité de singes mâles Rhésus exposés à des doses toxiques de soman (Kluwe 1987). Dans cette étude, des animaux ayant reçu une dose intra-musculaire de soman sont comparés à des singes intoxiqués recevant l'antidote (atropine, 0,4 mg/kg, im ; 2-PAM, 25,7 mg/kg, im.). Afin d'évaluer l'intérêt du pré-traitement, un troisième groupe d'animaux recevant de la PB (1,2 mg/kg, *p.o.*, 3 fois par jour pendant 2 jours) est constitué. L'intoxication au soman est réalisée 5 heures après la dernière prise de PB puis l'antidote immédiatement administré. La dose létale (DL) 50, correspondant à la dose nécessaire pour induire la mort de 50% des animaux intoxiqués, est alors déterminée ; les valeurs sont résumées dans le **tableau 5**. Cette étude montre l'efficacité du pré-traitement associé à l'antidote puisque la DL50 est augmentée d'un facteur 40 par rapport au groupe contrôle et d'un facteur 25 par rapport au groupe recevant l'antidote seul.

Groupe	DL50 (µg/kg)	IC 95%
Contrôle	15,3	13,7-17,1
Atropine + 2-PAM	25,1	22-28,8
Pré-traitement PB + atropine + 2-PAM	> 617	

**Tableau 5 :** effet du pré-traitement à la PB et du traitement post-exposition constitué de l'atropine et de 2-PAM sur la Dose Létale 50 (DL50) chez des singes mâles Rhésus exposés au soman. (2-PAM, 2-pyridine aldoxime methyl chloride). L'intervalle de confiance (IC) est également présenté.

Le traitement prophylactique constitué de la prise de PB permet donc de protéger l'AChE contre une inhibition irréversible par le soman. Cependant lors d'un conflit, il est impossible de prédire quel NOP pourrait être utilisé ; de ce fait l'utilisation prophylactique de la PB a été décidée lors de conflits armés.

### **3.5- Traitement prophylactique par la PB**

La décision d'utiliser la PB en traitement prophylactique contre une éventuelle intoxication aux NOPs était basée sur les stocks de ces armes chimiques. Pendant la « guerre froide », pas moins de 23 nations ont révélé posséder des NOPs alors que leur utilisation est interdite par la Convention de Genève de 1925 et par la Convention d'interdiction d'utilisation d'armes bactériologiques et biologiques de 1972.

#### **3.5.1 - Mode d'action de la PB**

En présence d'un neurotoxique, seul le pré-traitement à la PB suivi de l'administration de l'antidote permet une restauration de l'activité AChE. En effet, la PB est un carbamate qui se lie à l'AChE et l'inhibe de la même façon que les NOPs. De ce fait, pendant son inhibition par la PB, le site catalytique de l'enzyme n'est plus disponible pour fixer l'organophosphoré. L'enzyme est ainsi protégée d'une liaison éventuelle avec les NOPs et donc de son inhibition irréversible. Suite à son inhibition par la PB, l'AChE redevient fonctionnelle au bout de quelques heures par décarbamylation ou hydrolyse spontanée de la liaison PB-AChE. Suite à la décarbamylation, l'AChE est réactivée par la combinaison de l'atropine et de l'oxime.

Le pourcentage d'inhibition de l'AChE par la PB doit être suffisamment élevé pour observer une bonne efficacité du pré-traitement ; cependant il est également nécessaire de tenir compte des effets secondaires liés à la prise de PB. Une inhibition entre 20 et 40% de l'AChE sanguine permet de maintenir une protection suffisante pour parer à une éventuelle intoxication au soman, tout en limitant les effets secondaires liés à l'utilisation de la PB (van Haaren et al. 1999). Une étude a par ailleurs démontré que 30 mg de PB délivrés toutes les huit heures permet d'atteindre ce pourcentage d'inhibition (Dunn et al. 1997). Il est cependant à noter que le maximum d'efficacité prophylactique est atteint après la troisième prise, c'est-à-dire après 24h.

Dès les premiers signes d'intoxication, le traitement à la PB doit être arrêté et l'antidote constitué d'atropine, de pralidoxime et de diazépam donné immédiatement.

#### **3.5.2 - Effets secondaires liés au pré-traitement**

En tant qu'anticholinestérasique, la PB présente des effets secondaires dus à la réponse exacerbée des récepteurs cholinergiques. Les principales études réalisées ont été menées sur des vétérans de la première guerre du Golfe.

Parmi les effets muscariniques décrits par les vétérans, on distingue les troubles gastro-intestinaux (crampes abdominales, diarrhées, vomissements, nausées), une augmentation des sécrétions bronchiques et

lacrymales ainsi que des céphalées et une incontinence urinaire (Cook et al. 2001; Cook et al. 2002; Madsen et al. 2003).

Les effets nicotiniques se traduisent par des crampes et contractions musculaires, tremblements et difficultés de concentration (Keeler et al. 1991; Sharabi et al. 1991).

Au niveau du SNC, la PB est dépourvue d'effets secondaires. En conditions normales, la présence de son ammonium quaternaire empêche la molécule de pénétrer dans le cerveau via sa diffusion par la BHE (Dunn et al. 1997). La PB administrée à des doses variant de 30 à 60 mg toutes les huit heures n'affecte ni les fonctions cognitives ni les fonctions psychomotrices (Izraeli et al. 1990; Forster et al. 1994; Cook et al. 2002).

Ne traversant pas les membranes biologiques, la PB ne permet donc pas une protection efficace du SNC lors d'une intoxication par les NOPs. Dans le but de protéger l'AChE cérébrale, l'utilisation d'un autre carbamate a été envisagée. La physostigmine, autre anticholinestérasique réversible, possède en effet la faculté de traverser la BHE. Cette molécule est par ailleurs plus protectrice que la PB contre les effets délétères du soman et du sarin chez les rongeurs (Solana 1991). La physostigmine aurait ainsi constitué un solide candidat pour le traitement prophylactique lors de conflits armés. Cependant elle présente plusieurs inconvénients majeurs tels qu'un temps de demi-vie *in vivo* trop court (22 min chez l'Homme sain après administration orale, Somani & Husain 2001) et des effets secondaires apparaissant à des doses nécessaires pour une protection optimale. De ce fait la PB reste la molécule de choix pour un traitement prophylactique. C'est donc l'étude du métabolisme de la PB qui a permis le choix de cette molécule comme traitement contre la myasthénie mais également comme traitement prophylactique.

#### **4) Pharmacocinétique de la PB**

La pharmacocinétique de la PB a été étudiée chez de nombreuses espèces de rongeurs (rat, souris, cochon d'inde) et également chez le chien, le singe et l'Homme. Différentes voies d'administration ont été étudiées : intra-musculaire, intra-veineuse, intra-péritonéale, sous-cutanée et orale (Zhao et al. 2006).

Les principales études menées ont évalué les paramètres liés à l'absorption de la molécule, sa distribution, son métabolisme et son excrétion grâce à l'utilisation de PB marquée au <sup>14</sup>C au niveau du groupement méthyle de son ammonium quaternaire.

##### **4.1- Absorption de la PB**

Suite à une administration orale, la PB n'est que faiblement absorbée au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, la présence de son ammonium quaternaire polarise la PB et rend difficile son passage à travers les membranes biologiques. En raison de cette faible absorption intestinale, chez l'Homme, la dose nécessaire lors d'une administration orale doit être 30 fois supérieure à la dose d'une administration intraveineuse pour produire le même effet (Sorensen et al. 1984).

## **4.2- Distribution**

La PB est largement distribuée dans l'organisme et présente ainsi de nombreux sites d'action (Aquilonius & Hartvig 1986; Marino et al. 1998).

Après administration intra-musculaire (Birtley et al. 1966) ou orale (McEvoy 1991) de PB radiomarquée chez le Rat, la radioactivité est détectée au niveau de nombreux tissus tels que le cœur, les muscles squelettiques, les poumons, la peau et la rate. Par contre, aucune radioactivité n'est observée au niveau du cerveau, du thymus ni des corps graisseux.

L'analyse de l'activité AChE cérébrale montre que la PB n'est pas détectable au niveau du cerveau que ce soit suite à son administration intramusculaire (Birtley et al. 1966), sous-cutanée (Lallement 1998), orale (Sinton et al. 2000) ou intra-péritonéale (Chaney et al. 2000; Grauer et al. 2000). Par contre, certaines études montrent que la PB peut traverser le placenta (Roberts et al. 1970; Cook et al. 1992; Madsen et al. 2003).

## **4.3- Accumulation de la PB dans les tissus**

Chez des Rats ayant reçu de la PB marquée par voie sous-cutanée deux fois par jour pendant 16 jours, 76% de la dose est excrétée dans les urines sous forme inchangée ou de métabolites et 7% dans les fécès. Ceci montre l'accumulation de la PB et/ou de ses métabolites dans les tissus (Somani & Anderson 1977). Afin d'identifier ces sites de stockage, une étude complémentaire a été conduite. Les rats ont été sacrifiés à différents temps et plusieurs tissus analysés (poumon, muscle, cœur, foie, rein). Le principal site de stockage de la PB identifié est le tissu cartilagineux puisque sa concentration en PB augmente après administration répétée de la PB (Somani 1983).

Les auteurs soulignent la difficulté d'extraire et d'analyser la PB à partir d'échantillons biologiques. En effet ce composé, stable en milieu acide à 25°C et 70°C pendant 3 heures, est rapidement dégradé dans un milieu aqueux présentant un pH élevé (> 8,5) (Aquilonius & Hartvig 1986; Zhao et al. 2006).

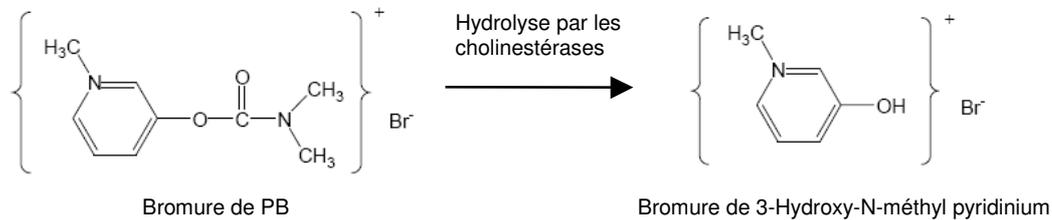
## **4.4- Métabolisme de la PB**

### **4.4.1 - Chez le Rat**

Après son administration orale, la PB est faiblement absorbée et est métabolisée en dérivés éliminés en majorité par les reins. La PB est principalement métabolisée par la BuChE plasmatique (Abu-Qare & Abou-Donia 2001) ainsi que par les enzymes hépatiques. Dans un premier temps, la PB se lie sur la cholinestérase (AChE ou BuChE) et l'inhibe. Puis, le complexe PB-AChE subit une décarbamylation entraînant la dissociation des deux molécules et la restauration de l'activité enzymatique. L'enzyme est alors capable d'hydrolyser la PB.

La PB est essentiellement hydrolysée dans le foie (Somani 1997; Abu-Qare & Abou-Donia 2008) en son principal métabolite : le 3-hydroxy-N-méthyl-pyridinium (3-HMP, **figure 12**). Si, en 1986, Aquilonius n'a démontré aucune activité biologique à ce composé, il semble pourtant que le 3-HMP soit un antagoniste cholinergique inhibant également l'AChE (Lee et al. 1992; Yanaura et al. 1993). D'autres

métabolites ont également été détectés dans le plasma ainsi que dans les urines (Somani et al. 1972; Taylor et al. 1991) ; aucune activité biologique spécifique ne leur a été attribuée.



**Figure 12 :** schéma de l'hydrolyse du bromure de PB formant son principal métabolite : le 3-hydroxy-N-méthyl-pyridinium bromide ou 3-HMP.

#### 4.4.2 - Chez l'Homme

Le métabolisme de la PB a principalement été étudié chez des patients myasthéniques (Kornfeld et al. 1970; Somani et al. 1972). Le foie semble être le principal site du métabolisme de la PB et tout comme chez l'animal, la PB est métabolisée en 3-HMP. Ces deux composés sont éliminés dans les urines (Kornfeld et al. 1970; Somani et al. 1972; Somani 1983).

#### 4.5- Excrétion

Chez l'Homme ou chez le Rat, différentes études ont montré que les reins participent à l'excrétion de la majorité de la PB et de son métabolite principal, le 3HMP (Kornfeld et al. 1970; Somani 1983; Aquilonius & Hartvig 1986; Madsen et al. 2003).

##### 4.5.1 - Chez le Rat

L'administration de PB par voie orale (gavage) (500 µg, Husain et al. 1968) ou par voie intramusculaire (100 µg, Birtley et al. 1966) permet de montrer que la PB est principalement excrétée par les urines. L'excrétion maximale se produit entre 1 et 3 heures après administration. En 24 heures, la PB est principalement excrétée dans les urines (essentiellement sous forme de PB non métabolisée) (Husain et al. 1968).

##### 4.5.2 - Chez l'Homme

Chez l'Homme, la pharmacocinétique de la PB a été étudiée chez des insuffisants rénaux (Cronnelly et al. 1980). Suite à une transplantation rénale, la cinétique d'élimination de la PB (0,35 mg/kg par minipompe) est similaire à celle des volontaires sains (demi-vie d'élimination = 112 ± 12 min). Chez les patients présentant des atteintes rénales sévères, le temps d'élimination est plus long (demi-vie d'élimination = 379 ± 162 min).

**4.6- Tableau récapitulatif**

Le **tableau 6** présente un récapitulatif des données obtenues lors des différentes études précédemment citées et conduites chez le Rat, chez le volontaire sain ou myasthénique et chez les insuffisants rénaux. Ces différents travaux montrent que la demi-vie d'élimination de la molécule dépend de l'espèce étudiée, ainsi que de la posologie et la voie d'administration choisies pour le traitement par la PB.

Espèce	Dose de PB	Voie d'administration	T <sub>1/2</sub> plasmatique	Concentration plasmatique maximale	Source
Rat	0,5-2 µmol/kg	IV	24 min		(Yamamoto et al. 1995)
	0,056 mg/kg	IM	25 min		(Meyer et al. 1988)
Homme sain	4 mg	IV	97 min	6,7± 2,1 mg/mL	(Breyer-Pfaff et al. 1985)
	60 mg	orale	200 min	20-100 mg/mL	(Breyer-Pfaff et al. 1985)
	2,5 mg	IV	112 min		(Aquilonius et al. 1980)
	120 mg	orale	138 min		(Aquilonius et al. 1980)
	0,35 mg/kg	IV	112 min	700-1800 mg/mL	(Cronnelly et al. 1980)
Homme présentant des dysfonctions rénales sévères	0,35 mg/kg	IV	379 min		(Cronnelly et al. 1980)
Patients myasthéniques	60 mg	orale	30-90 min	40-60 mg/mL	(Aquilonius & Hartvig 1986)
	180-1440 mg/24h	orale	90 min	180 mg/mL	(Sorensen et al. 1984)

**Tableau 6** : données pharmacocinétiques obtenues chez le Rat et l'Homme pour différentes doses de PB et différentes voies d'administration : intra-veineuse (IV), orale ou intra-musculaire (IM).

La pharmacocinétique et le mode d'action du bromure de pyridostigmine ont été largement étudiés. Aucun effet secondaire au niveau du SNC n'a été relevé dans le traitement de la myasthénie grave, depuis le début de son utilisation en 1955. En effet, sa polarité empêcherait la PB de pénétrer au niveau cérébral. Toutefois les enquêtes épidémiologiques réalisées sur les vétérans de la première guerre du Golfe remettent en cause son innocuité à long terme, en particulier lorsque son administration a été associée à des agents rencontrés en conditions opérationnelles : insecticides, pesticides, stress... Ces données doivent être étayées par des études expérimentales. Toutefois, la prescription de pyridostigmine comme mesure prophylactique en cas de menace chimique ne peut, à l'heure actuelle, être remise en cause particulièrement en cas de dispersion de soman. Il est, par conséquent, nécessaire d'enrichir les études concernant la pharmacovigilance de la molécule.

## CHAPITRE III : Physiologie du stress

La notion de stress est difficile à définir. D'un point de vue biologique, le stress est la réponse de l'organisme à toute sollicitation qui lui est faite. Considéré comme une réaction d'adaptation de l'organisme pour maintenir l'homéostasie, il s'agit d'une activation de l'ensemble de l'organisme face à une situation nouvelle ou menaçante. Il est nécessaire de bien différencier le stress (la réaction de l'organisme) et de ses conséquences (maladie, anxiété, irritation).

A ses débuts, le concept de stress était limité à l'idée d'une suite de réactions biologiques. Il a évolué avec les diverses théories scientifiques qui ont tenté de le développer, pour devenir actuellement une notion plus large, interactive entre l'individu et l'environnement. C'est à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle que les premières études sur le stress, qui ne portaient pas encore ce nom, ont commencé. En 1868, le physiologiste français Claude Bernard (1813-1878) introduit la distinction entre le milieu intérieur intra-organique et le milieu extérieur extra-organique, entre lesquels il existe des rapports nécessaires d'échanges et d'équilibre. Selon lui, toutes les réactions d'un sujet n'ont qu'un but : celui de maintenir les constances du milieu intérieur. Ce concept a été développé, au début du 20<sup>ème</sup> siècle, par le neurophysiologiste américain Walter Cannon dans son ouvrage « *The Wisdom of the body* ». Il y décrit les mécanismes régissant cette constance corporelle, qu'il dénomme « homéostasie » signifiant « tendance des corps vivants à stabiliser leur organisme ». Il est alors le premier à employer le mot « stress » pour désigner les agressions susceptibles de perturber l'homéostasie (Cannon 1929). Il définit cette notion comme une fonction fondamentale assurée par un ensemble de processus dynamiques visant au maintien du milieu interne.

Ce n'est qu'en 1936 que l'endocrinologue canadien Hans Selye (1907-1983) utilise le terme « stress » en médecine. Dans son ouvrage « *stress of life* », il décrit le stress comme une réponse défensive d'alarme émanant d'un organisme menacé. A partir de nombreuses expérimentations sur les rats, il élabore la première théorie complète du « stress » médical. « Le stress est indispensable à la vie et l'absence totale de stress, c'est la mort » (Selye 1936). Cette phrase traduit la connotation négative du stress (les conséquences délétères du stress inadapté ou « distress ») mais également positive (la réponse adaptée de l'organisme ou « eustress »). Le concept de stress a donc évolué et changé de signification au cours des années, de *cause* déclenchante avec Cannon, il devient *effet* consécutif avec Selye. Selon lui, le stress est « une réponse non spécifique que donne le corps à toute demande qui lui est faite » qu'il baptise « syndrome général d'adaptation » (Selye 1936; Selye 1950). L'endocrinologue met en exergue l'implication d'un système composé de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des glandes surrénales : l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA). Aujourd'hui, on admet que cet axe n'est pas le seul impliqué dans la réponse au stress : les systèmes nerveux sympathique et parasympathique, le système immunitaire et certaines structures du cerveau font également partie intégrante de cette réponse au stress.

Après avoir évoqué les différentes définitions attribuées au terme « stress », nous présenterons sa symptomatologie et les différentes réponses neuroendocrines qu'il induit. Par la suite, nous nous intéresserons aux divers comportements et aux différentes expressions géniques affectées par le stress.

### **1) Définition du stress**

Etymologiquement, le mot « stress » provient du latin « stringere » qui signifie « mettre sous tension ». Au regard des définitions habituelles, une ambiguïté apparaît quant au sens propre du terme de stress. En effet se réfère-t-il à l'agent inducteur ou à l'état induit ?

Différentes définitions entrevoient le « stress » comme la situation subie par l'organisme. Ainsi, selon l'encyclopédie Encarta, il s'agit « d'un agent ou processus physique, chimique, émotionnel qui s'exerce sur l'organisme et provoque une agression ou une tension pouvant devenir pathologique ». Le « stress » correspond, pour le Flammarion Médecine, « à une agression contre un organisme vivant ; il s'agirait des réactions biologiques et psychologiques d'un organisme face à une situation nouvelle de quelque origine qu'elle soit, dangereuse ou agréable ».

Cependant d'autres définitions données au mot « stress » décrivent la réaction de l'organisme à une situation. Selon l'encyclopédie Universalis, le « stress » désigne « une réaction de l'organisme à un agent d'agression ou à un traumatisme quelconque ». Ce même terme est défini, par le dictionnaire Larousse, comme « une réponse de l'organisme aux facteurs d'agressions physiologiques et psychologiques ainsi qu'aux émotions (agréables ou désagréables) qui nécessitent une adaptation ».

### **2) Symptomatologie du stress**

Hans Selye introduit le concept de stress en proposant une étroite collaboration entre le système nerveux sympathique et les glandes surrénales dans la réponse au stress (Selye 1936). Cette réponse non spécifique de l'organisme est appelée, dès 1950, « syndrome général d'adaptation » ou SGA et évolue, dans le temps, en trois phases : l'alarme, la résistance et l'épuisement. La phase d'alarme correspond à l'ensemble des réponses de l'organisme à une perturbation soudaine. Il s'agit d'une réaction biologique initiale de courte durée (catabolisme, hypoglycémie, sécrétion catécholaminergique surrénalienne). La phase de résistance correspond à la mobilisation de processus physiologiques permettant de résister (anabolisme, sécrétion de glucocorticoïdes) dans le cas où la perturbation perdurerait. Si le stress persiste trop longtemps, survient la phase d'épuisement ; l'organisme n'est alors plus capable de s'adapter. S'ensuivent de nombreuses complications du stress, souvent caractérisées par des maladies inflammatoires.

Il n'est pas nécessaire que ces trois phases interviennent pour que l'on puisse parler de SGA.

#### **2.1- La réaction d'alarme**

Pendant cette première phase, l'organisme va tout faire pour s'adapter à la nouvelle situation. C'est la réaction de stress proprement dite, identique quel que soit l'agent inducteur. Seule son intensité varie. Cette phase peut durer de quelques minutes à 24 heures.

Par le biais du système nerveux sympathique, l'hypothalamus stimule les glandes médullo-surrénales, déclenchant alors la sécrétion d'adrénaline et de noradrénaline. Ces hormones provoquent une augmentation de la pression artérielle, l'accélération du rythme cardiaque et l'augmentation de la glycémie. Elles ont pour but immédiat de mobiliser les stocks d'énergie par des procédés de lipolyse (destruction des graisses) et glyco-génolyse (mise en circulation du glycogène de réserve), dans le but de fournir une énergie suffisante aux muscles. Parallèlement à cette hyperactivation, les fonctions qui n'ont aucun rôle dans la réponse au stress sont mises au repos. Les hormones sexuelles et thyroïdiennes sont ainsi inhibées.

En conclusion, la production de catécholamines par les glandes médullo-surrénales vise la mobilisation puis la dépense d'énergie dans une réaction d'urgence à court terme favorisant la fuite ou la lutte en permettant aux muscles d'accroître leur fonctionnement.

## **2.2- La réaction de résistance**

Cette deuxième phase constitue l'ensemble des réactions non spécifiques provoquées par un agent stressant qui persiste et auquel l'organisme s'est adapté au cours de la phase précédente. La phase d'alarme est très coûteuse pour l'organisme qui se doit de compenser les pertes d'énergie. L'organisme entame alors une phase de résistance afin de rassembler des ressources pour retrouver un nouvel équilibre. A ce stade, le stress est encore considéré comme bénéfique pour l'organisme.

Au niveau neuro-endocrinien, cette phase s'explique par l'activité de l'axe HPA, sollicité dès la phase d'alarme. La sécrétion de CRF (corticotrophin releasing factor) par les noyaux antérieurs et latéraux de l'hypothalamus induit la production d'ACTH par le lobe antérieur de l'hypophyse.

La quantité d'ACTH dans le sang va moduler, quant à elle, la sécrétion hormonale par les corticosurrénales. Ainsi sont libérés (i) des glucocorticoïdes destinés à cataboliser les réserves d'énergie sous forme d'hydrate de carbone ; (ii) des minéralocorticoïdes qui interviennent dans l'homéostasie ionique en favorisant par exemple la conservation du sodium dans le sang. Ces deux hormones ont, comme l'adrénaline et la noradrénaline, la faculté de stimuler la synthèse de glucose et son absorption par les cellules. Parallèlement à l'action du CRF et de l'ACTH, elles inhibent certaines fonctions consommatrices d'énergie, comme la croissance ou la reproduction. Enfin, elles jouent un rôle très important dans l'autorégulation du stress : en bloquant la synthèse de CRF et d'ACTH, les glucocorticoïdes limitent leur propre production. On assiste alors à une boucle de rétrocontrôle. Ces hormones ont également la faculté d'inhiber l'immunité.

Les glucocorticoïdes et les catécholamines constituent les principales hormones du stress. Cependant les cytokines pro et anti-inflammatoires sont également impliquées dans la réponse au stress (McEwen 2008). Ces cytokines sont produites par de nombreuses cellules et sont également régulées par les glucocorticoïdes et les catécholamines. En effet, les catécholamines semblent augmenter la production de cytokines pro-inflammatoires tandis que les glucocorticoïdes l'inhiberaient (Sapolsky et al. 2000). Le

concept même de l'allostase traduit donc l'existence de multiples interactions entre ces différents médiateurs.

### **2.3- La phase d'épuisement**

Elle marque la fin de la période de résistance avec épuisement des ressources et abandon de l'effort si le stress perdure trop longtemps. L'organisme n'est alors plus à même de pouvoir s'adapter à ce qui lui est demandé ; il est incapable de compenser les pertes d'énergie, les défenses immunitaires faiblissent et rendent l'organisme plus sensible aux agressions externes. L'épuisement se caractérise par un retour à la phase initiale de choc mais cette fois les phénomènes d'épuisement l'emportent sur la défense active et peuvent conduire jusqu'à la maladie ou à la mort. Le SGA a donc ses limites, des limites physiologiques qui font que l'organisme ne peut pas aller au-delà de ses capacités.

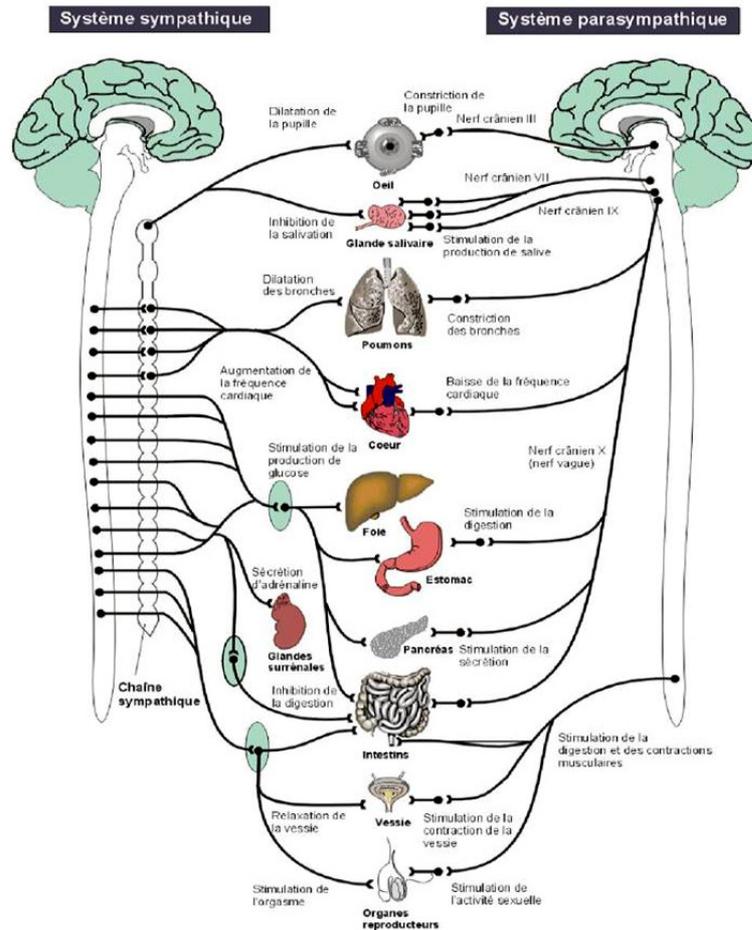
Quel que soit le stressor, il existe une réponse neuro-endocrinienne de l'organisme participant à son adaptation aux diverses modifications de l'homéostasie. De la perception du danger à la sécrétion d'hormones préparant l'organisme à y faire face, la réponse met successivement en jeu différentes composantes : (i) le système nerveux autonome, (ii) l'hypothalamus, (iii) l'hypophyse et (iv) les glandes surrénales. Ces trois dernières structures constituent l'axe HPA. Une boucle de rétrocontrôle négatif est formée entre elles dans laquelle l'excès de glucocorticoïdes produits active les récepteurs du cerveau et inhibe la production de CRF et d'ACTH.

## **3) Composante neuroendocrine du stress**

### **3.1- Le système nerveux autonome**

Le système nerveux autonome est responsable de la régulation des différentes fonctions internes (cardiovasculaire, pulmonaire, rénale, digestive...) de l'organisme. Ces fonctions internes ont pour rôle d'assurer l'homéostasie de l'organisme et de lui permettre ainsi l'adaptation à tout changement. Le terme « autonome » indique que cette régulation s'opère inconsciemment. Le système nerveux autonome possède deux composantes desservant généralement les mêmes organes : le système nerveux sympathique et le système nerveux parasympathique.

Au niveau du système nerveux autonome, les neurones innervent les cellules des muscles lisses, du muscle cardiaque, des structures glandulaires et des cellules qui possèdent des fonctions immunitaires. La subdivision en sympathique et parasympathique repose sur des considérations anatomiques et physiologiques. Ces deux sous-ensembles permettent une double innervation par des fibres nerveuses, aux actions opposées, qui aboutit à l'existence d'un contrôle très précis de l'organe effecteur (**figure 13**).



**Figure 13 :** schéma des deux composantes du système nerveux autonome : le système sympathique et le système parasympathique (d'après [www.tpe.walrey.fr/cerveau](http://www.tpe.walrey.fr/cerveau)).

### 3.1.1 - Le système sympathique

Dans l'ensemble des actions, le sympathique aide l'organisme à s'adapter à un environnement qui peut apparaître comme délétère ; il est alors mis en jeu dans des situations d'urgences ou d'émotions fortes, comme la peur ou la colère. Il est responsable du contrôle d'un grand nombre de fonctions involontaires de l'organisme telles que le rythme cardiaque ou la contraction des muscles lisses. Il exerce ses effets sur les cellules et organes cibles essentiellement via les catécholamines. Il fonctionne sur un modèle à deux neurones : un neurone pré-ganglionnaire (dont le corps cellulaire est localisé dans la moelle épinière dorsale ou lombaire) fait synapse avec un neurone post-ganglionnaire (dont le corps cellulaire est localisé dans un ganglion) qui lui-même innerve le tissu cible. Le neurotransmetteur des neurones pré-ganglionnaires est l'ACh, tandis que celui des neurones post-ganglionnaires est en général la noradrénaline. Le système sympathique innerve, en particulier, les glandes médullo-surrénales.

### 3.1.2 - Le système parasympathique

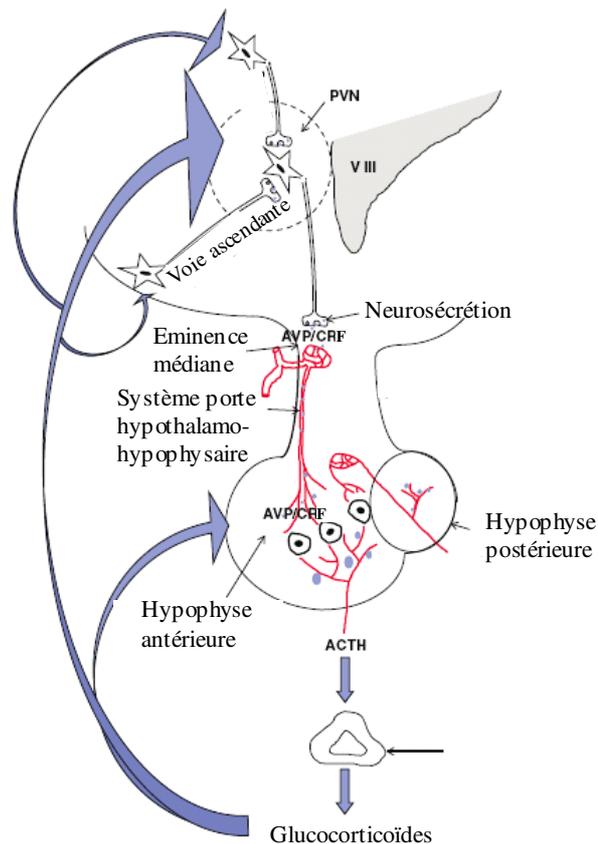
Les fibres nerveuses du système parasympathique prennent leur origine dans les nerfs crâniens (nerfs III, VII, IX et X) et de la moelle épinière. Le système parasympathique contrôle les activités involontaires

des organes, des glandes et des vaisseaux sanguins ; ses effets sont le plus souvent opposés à ceux du système nerveux sympathique. Le système parasympathique est responsable du ralentissement de la fréquence cardiaque (cardio-modérateur), de l'augmentation des sécrétions digestives et de la mobilité du tractus gastro-intestinal. Comme le système sympathique, il fonctionne sur un modèle à deux neurones. Le neurotransmetteur des fibres pré et post-ganglionnaires parasympathiques est toujours l'ACh.

Suite à un stress, les systèmes sympathique et parasympathique activent l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

### 3.2- L'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien (axe HPA)

L'une des particularités de cet axe est l'existence d'interactions entre l'hypothalamus, le lobe antérieur de l'hypophyse (adénohypophyse) et la glande surrénale (plus particulièrement le cortex surrénalien qui sécrète le cortisol (corticostérone chez les animaux)) (**figure 14**). Ces interactions constituent l'axe HPA, partie importante du système neuroendocrine, contrôlant les réponses au stress et régulant de nombreux processus biologiques.



**Figure 14** : représentation schématique de l'axe HPA (d'après Buckingham 2006).

Il existe deux types de systèmes hypothalamo-hypophysaires :

- le premier associe la zone parvocellulaire du noyau hypothalamique paraventriculaire (PVN) et le lobe antérieur de l'hypophyse : c'est la portion hypothalamo-antéhypophysaire
- le second dit hypothalamo-neurohypophysaire comprend la zone magnocellulaire du PVN, le noyau supra-optique (SON) et le lobe postérieur de l'hypophyse.

Ces deux systèmes se différencient par le fait que les connexions entre l'hypothalamus et l'adénohypophyse sont vasculaires alors que celles reliant l'hypothalamus à la neurohypophyse sont nerveuses. L'hypophyse antérieure est influencée par les facteurs hypothalamiques via le système porte. L'hypophyse postérieure est le lieu de terminaison des axones de l'hypothalamus antérieur.

### 3.2.1 - Le système hypothalamo-antéhypophysaire

Les neurones de la zone parvocellulaire du PVN de l'hypothalamus projettent leurs axones au niveau de l'éminence médiane vers l'hypophyse antérieure. La vascularisation entre l'hypothalamus et l'hypophyse antérieure est réalisée par le système porte hypothalamo-hypophysaire.

Sous l'effet d'un stresser, l'hypothalamus est stimulé au niveau des noyaux PVN. Les neurones de ces noyaux, possédant des propriétés neurosécrétoires, sécrètent alors deux neuropeptides que sont le corticotropin-releasing factor (CRF) et la vasopressine (AVP) qui pénètrent dans le système porte hypothalamo-hypophysaire (Spiess et al. 1981; Smith & Vale 2006; Kolber et al. 2008). Le CRF stimule les cellules corticotropes de l'ante-hypophyse (3 à 10% de la quantité totale des cellules) par des récepteurs spécifiques au CRF de type I, récepteurs couplés aux protéines G dont la signalisation implique l'AMPC (Jacobson 2005). L'AVP potentialise l'effet du CRF par l'intermédiaire des récepteurs à vasopressine  $V_{1b}$  (Lupien & McEwen 1997; Engelmann et al. 2004; Ing 2005; Smith & Vale 2006).

En réponse à la liaison du CRF ou de l'AVP sur leurs récepteurs, les cellules corticotropes synthétisent la POMC (pro-opiomélanocortine) (DeBold et al. 1983), polypeptide de 241 acides aminés (AA). Celle-ci subit alors plusieurs clivages conduisant à la formation d'hormone adrénocorticotrope (ACTH), un peptide de 39 AA, d'endorphines et d'hormone mélanostimulante (MSH). Ces différentes substances sont co-sécrétées et la MSH paraît avoir un rôle potentialisateur de l'effet de l'ACTH sur le cortex surrénalien. La liaison de l'ACTH sur les récepteurs situés au niveau du cortex surrénalien provoque la libération de glucocorticoïdes.

### 3.2.2 - Le système hypothalamo-neurohypophysaire

Comme précisé précédemment, il comprend la zone magnocellulaire du PVN et du noyau supra-optique (SON) dont les neurones se projettent au niveau du lobe postérieur de l'hypophyse via l'éminence médiane. Comme les noyaux PVN, les noyaux SON de l'hypothalamus synthétisent l'ocytocine et la vasopressine. Ces deux hormones, stockées dans des granules sécrétoires, circulent par les axones hypothalamiques vers le lobe postérieur de l'hypophyse. Lorsqu'un stimulus nerveux parvient à ces

noyaux, les granules libèrent leur contenu dans l'hypophyse postérieure et les hormones pénètrent dans le système sanguin. Outre le CRF, la vasopressine et l'ocytocine peuvent donc directement stimuler la libération d'ACTH mais également agir en synergie avec le CRF afin de potentialiser la libération d'ACTH (Liu et al. 1983; Link et al. 1992).

Ces deux hormones peuvent atteindre l'hypophyse antérieure par deux voies circulantes. La première, l'éminence médiane, constitue une voie commune au transport de l'AVP et du CRF sécrétés par les neurones parvocellulaires. La seconde correspond à une voie portale plus courte reliant l'hypophyse antérieure et postérieure. L'AVP et l'ocytocine libérées au sein des noyaux hypothalamiques inhibent les neurones parvocellulaires et magnocellulaires du PVN et du SON (Engelmann et al. 2004), permettant une action modulatrice de la sécrétion d'ACTH et de cortisol.

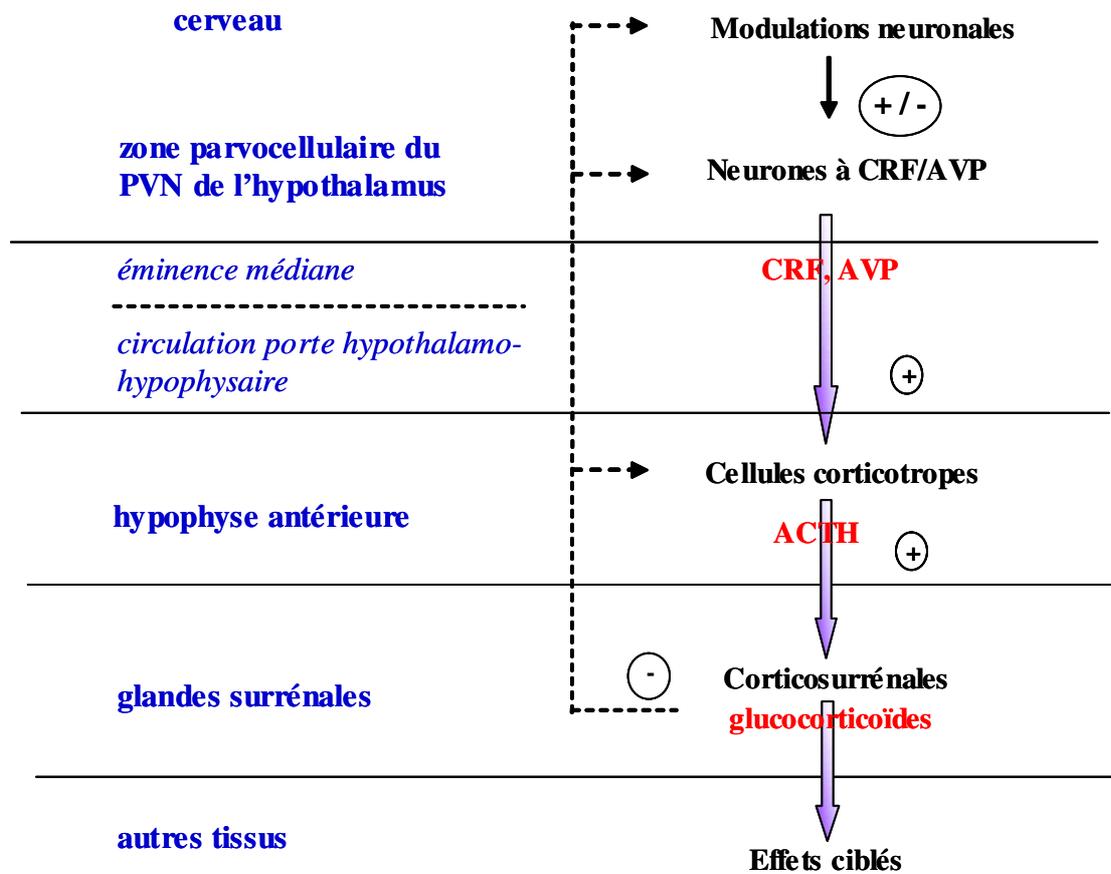
### 3.2.3 - Le système hypophyso-corticosurrénalien

Les glandes surrénales sont deux glandes endocrines situées au-dessus de chaque rein. Elles sont principalement responsables de la gestion des situations stressantes (via la synthèse de corticostéroïdes et de catécholamines) et de l'homéostasie hydro-sodée (via la synthèse d'aldostérone). Elles sont divisées en deux structures distinctes :

- la médullo-surrénale : principale source corporelle d'hormones du groupe des catécholamines. Elle sécrète l'adrénaline et la noradrénaline, composantes circulantes de l'activation sympathique ;
- la cortico-surrénale sécrète les hormones stéroïdiennes selon la zone stimulée. De l'extérieur vers l'intérieur, on distingue : (i) la zone glomérulée synthétisant principalement les minéralocorticoïdes (aldostérone) ; (ii) la zone fasciculée synthétisant les hormones corticoïdes (cortisol chez l'Homme et corticostérone chez le Rat) et (iii) la zone réticulée synthétisant les hormones androgènes (déhydroépiandrostérone) et sexuelles (testostérone chez l'homme et oestrogène et progestérone chez la femme).

L'ACTH hypophysaire véhiculée par la circulation sanguine périphérique jusqu'aux glandes surrénales se lie aux récepteurs mélanocortine de type 2 présents dans la corticosurrénale, stimulant ainsi la stéroïdogénèse par la voie de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (Smith & Vale 2006).

En résumé, l'axe HPA représente une chaîne d'amplification d'un facteur mille à un million à chaque étage (picomole de CRF, micromole d'ACTH et millimole de glucocorticoïdes). Les glucocorticoïdes sont les effecteurs terminaux de l'axe. Ils régulent les fonctions métaboliques, cardio-vasculaires, immunitaires, reproductrices, comportementales et cognitives (Lupien & McEwen 1997). Ils exercent également un rétro-contrôle inhibiteur à tous les étages de l'axe HPA (**figure 15**).



**Figure 15** : représentation schématique de la structure de l'axe hypothalamo-hypophysaire-corticosurrénalien (d'après Watts 2005).

### 3.3- Les glucocorticoïdes

Libérés au cours du stress par les glandes surrénales, les glucocorticoïdes présentent de nombreuses fonctions : réponse à un évènement stressant, effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, antipyrétiques, analgésiques (Ashwell et al. 2000; Sapolsky et al. 2000).

#### 3.3.1 - Les récepteurs intracellulaires aux glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes peuvent se lier à deux types de récepteurs, les récepteurs dits de type 1 ou récepteurs aux minéralocorticoïdes, MR (Gerlach & McEwen 1972) et les récepteurs de type 2 ou récepteurs aux glucocorticoïdes, GR (Reul & de Kloet 1985). Ces deux types de récepteurs appartiennent à la famille des récepteurs hormonaux nucléaires. Ils partagent une structure composée de trois domaines : (i) un domaine N-terminal activant les gènes cibles en interagissant avec d'autres facteurs de transcription ; (ii) un domaine central en « doigt de zinc » constituant le domaine de liaison à l'ADN et participant à la dimérisation des récepteurs, à la translocation nucléaire grâce à la séquence de localisation nucléaire (NLS) et à la transactivation ; (iii) un domaine C-terminal de liaison au ligand contenant aussi des séquences de

liaison aux protéines de choc thermique, de translocation nucléaire, de dimérisation et de transactivation (Bamberger et al. 1996; van der Laan & Meijer 2008).

Les GR sont principalement exprimés dans les tissus périphériques et au niveau de certaines régions cérébrales : cortex, amygdale, hippocampe, septum, thalamus, hypothalamus, hippocampe, cervelet, locus coeruleus, noyau dorsal du raphé. Les MR sont généralement restreints aux tissus périphériques cibles des minéralocorticoïdes (reins) et à certaines régions cérébrales dont l'hippocampe, le septum latéral et l'hypothalamus (PVN) (Han et al. 2005; Jacobson 2005; Sam & Frohman 2008). Ces deux types de récepteurs sont donc colocalisés dans l'hippocampe (région CA1, CA2 et gyrus dente) et l'hypothalamus (PVN et noyau arqué) (Han et al. 2005; van der Laan & Meijer 2008). Les rétro-actions inhibitrices des glucocorticoïdes sur l'axe HPA impliquent la liaison sur des GR au niveau de l'hypophyse et de l'hypothalamus et sur des MR dans d'autres structures cérébrales telles que l'hippocampe (Jacobson 2005; Sam & Frohman 2008).

L'affinité des deux types de récepteurs à leur ligand est différente. Les GR montrent une faible affinité pour le cortisol. Inversement, les MR ont une forte affinité pour celui-ci (10 fois plus que les GR) et l'aldostérone (de Kloet et al. 2005; Reul & de Kloet 1985).

Ces différences de localisation et d'affinité entre les deux types de récepteurs leur confèrent un rôle distinct. En phase de repos (environ 0,10-0,20 µg/mL de corticostérone plasmatique chez le Rat), seuls les MR sont occupés, à 90%. En phase d'activité suite à un événement stressant, les MR sont saturés et les GR occupés à 50%. Ainsi, les MR réguleraient le tonus basal de l'activité de l'axe HPA avec une efficacité fonction de la quantité de récepteurs MR. Les GR sont des médiateurs du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes avec une efficacité dépendante des quantités de glucocorticoïdes et de récepteurs GR (Reul & de Kloet 1985; De Kloet et al. 1998).

Alors que les concentrations plasmatiques en cortisol reflètent l'activité de l'axe HPA, elles ne constituent pas un bon indicateur de la disponibilité en glucocorticoïdes pour les cellules cibles.

### 3.3.2 - Régulation de la disponibilité en glucocorticoïdes

La disponibilité en glucocorticoïdes sécrétés est régulée par différents mécanismes : (i) une grande partie des glucocorticoïdes circulants (environ 95%) est liée à la corticosteroid-binding-protein ou CBG (van der Laan & Meijer 2008). Cette glycoprotéine sécrétée par le foie maintient les glucocorticoïdes sous forme inactive ; (ii) l'activité des glucocorticoïdes est fortement corrélée à l'action de deux iso-enzymes : les 11β-hydroxystéroïdes déshydrogénases (11βHSD) de type 1 et 2. La 11βHSD2 est responsable de la déshydrogénation de la corticostérone en 11-déhydrocorticostérone. La 11βHSD1 est une réductase,

transformant la 11-déhydrocorticostérone inactive en corticostérone active ; (iii) l'accès des glucocorticoïdes au cerveau est contrôlé par la pompe P-glycoprotéine au niveau de la BHE (Meijer et al. 1998).

### 3.3.3 - Mécanismes d'action des glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes agissent via des mécanismes génomiques (à moyen et long terme) et via des mécanismes non génomiques (à court terme).

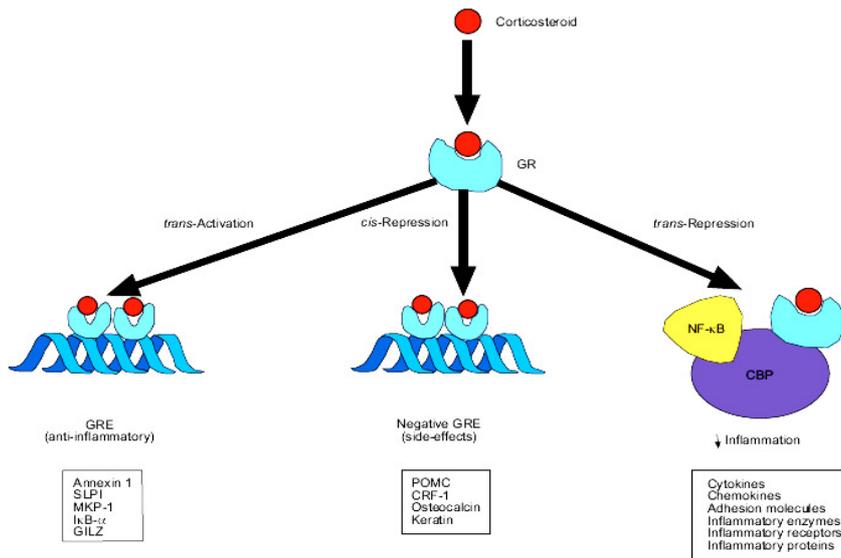
#### Les mécanismes génomiques

##### *Modulation de la transcription des gènes*

Les glucocorticoïdes sont des composés lipophiles diffusant facilement à travers les membranes cellulaires pour se lier aux récepteurs aux glucocorticoïdes (MR et GR) au niveau du cytoplasme. Ces récepteurs sont présents dans le cytosol sous forme inactive car liés à des protéines chaperons telles que les Heat shock proteins (Hsp) (Barnes 2006; Liberman et al. 2007). Ceci empêche leur localisation nucléaire. Suite à leur interaction avec les glucocorticoïdes, les récepteurs se dissocient de la protéine chaperonne. Le site NLS de ces récepteurs étant exposé, le complexe récepteur/ligand migre dans le noyau (Liberman et al. 2007) où il agit sur l'expression du génome en activant ou inhibant la transcription.

Pour activer la transcription de gènes, le complexe glucocorticoïde-récepteur se fixe sous forme de dimère à une séquence d'ADN spécifique appelée « élément de réponse aux glucocorticoïdes » (GRE). La séquence consensus du GRE comprend deux séquences palindromiques de 6 paires de bases, séparées par 3 nucléotides, formant deux sites de liaison pour les glucocorticoïdes. Des sites GRE négatifs ont été identifiés au niveau du promoteur de gènes tels que la POMC et le CRF, principales hormones régulant l'axe HPA (Barnes 2006; van der Laan & Meijer 2008). L'activation du récepteur résulte, directement ou indirectement, en la stimulation ou la répression de gènes cibles respectivement appelées trans-activation et cis ou trans-répression (van der Laan & Meijer 2008) (**figure 16**). La trans-activation concerne, entre autres, les gènes dont les produits contrôlent la néoglucogenèse, la tension artérielle et l'équilibre osmotique.

Les glucocorticoïdes et leurs récepteurs répriment les gènes via deux mécanismes distincts : soit le récepteur se lie sous forme de dimère à l'ADN au niveau d'un élément de réponse négatif (nGRE) (cis-répression), soit il inhibe d'autres facteurs de transcription sans qu'il ait besoin de dimériser ni de se fixer directement à l'ADN (trans-répression dite dépendante de l'ADN).



**Figure 16** : voies d'action des glucocorticoïdes via les mécanismes génomiques (d'après Barnes 2006).

#### *Modulation post-transcriptionnelle*

Les glucocorticoïdes agissent aussi sur la stabilité des ARNm, leur traduction en protéines (Lee et al. 1988; Stellato 2004), leur dégradation et la libération des protéines (Walker et al. 1997; Bergmann et al. 2004). Ainsi, ils sont responsables de l'inhibition de nombreuses enzymes indispensables aux cascades inflammatoires soit par trans-répression, soit en augmentant la transcription d'inhibiteur endogène de ces voies (Barnes 2006). Les glucocorticoïdes diminuent la stabilité des ARNm en passant, probablement, par des interactions protéines-protéines entre le complexe GR-glucocorticoïdes et la protéine de liaison aux ARNm responsable de la cascade de signalisation stabilisant les ARNm (Stellato 2004). Les glucocorticoïdes pourraient aussi diminuer la stabilité des ARNm de leurs propres récepteurs (Ing 2005).

#### *Les mécanismes non-génomiques*

Le délai d'action des glucocorticoïdes par voie génomique est long : 10-30 min de translocation nucléaire, 5 à 120 minutes de transcription et de traduction aboutissant à un délai théorique d'action minimum de 15 min, mais souvent plus long (Makara & Haller 2001). Des effets plus rapides que 15 min sont toutefois observés, faisant suspecter des mécanismes d'action non génomiques (Buckingham 2006).

#### *Action rapide sans implication de récepteurs*

Ce mode d'action des glucocorticoïdes passe par l'altération des propriétés physico-chimiques de la membrane cellulaire sans intervention de récepteur (Falkenstein et al. 2000; Stellato 2004). Ainsi, les glucocorticoïdes se lient aux membranes synaptiques et (i) modulent la liaison de la calmoduline aux membranes en augmentant leur présence dans les vésicules synaptiques et (ii) activent la fonction des canaux calciques voltage-dépendants. Ces effets, surtout observés *in vitro*, nécessiteraient des concentrations très élevées de glucocorticoïdes.

*Action rapide médiée par les récepteurs membranaires*

La majorité des effets rapides des glucocorticoïdes passerait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires, soit spécifiques aux glucocorticoïdes, soit par des récepteurs aux neurotransmetteurs. Ces récepteurs spécifiques se distinguent nettement des GR par leurs propriétés de liaison aux glucocorticoïdes (Adcock et al. 2006). Les protéines Hsp70 et 90 interagissent avec ces récepteurs probablement de la même manière qu'avec les GR (Powell et al. 1999). Les actions rapides sont liées à des voies de signalisation intracellulaires comme observé lors du couplage des protéines G et des kinases incluant la MAPK et la PI3K (Adcock et al. 2006). Ce mode d'action semble être impliqué dans le contrôle des processus mnésiques (Tasker et al. 2006) et dans le contrôle des maladies inflammatoires (Adcock et al. 2006).

3.3.4 - Les actions anti-inflammatoires des glucocorticoïdes

L'effet anti-inflammatoire passe par des mécanismes de la voie génomique et de la voie non génomique. Par voie génomique, les glucocorticoïdes activent la synthèse de protéines anti-inflammatoires dont les gènes possèdent une séquence GRE comme IκB, la MAPK phosphatase-1, l'Il-1ra, l'Il-10 (Barnes 1998; Smoak & Cidlowski 2004; Barnes 2006). Ils interagissent également avec des facteurs de transcription inhibant la transcription de nombreuses cytokines telles que l'Il-1β, Il-2, Il-3, Il-6, TNFα (tumor necrosis factor α) (Barnes 1998; Smoak & Cidlowski 2004; Barnes 2006). Enfin, ils diminuent la stabilité et la traduction des ARNm d'un grand nombre de gènes inflammatoires possédant une séquence ARE (adénine/uridine rich element): Il-1, le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), TNFα, Il-6, iNOS (inducible nitric oxyde synthase) (Stellato 2004). Par voie non génomique et médiée par les GR, les glucocorticoïdes induisent la libération des protéines Hsp du complexe cytosolique GR-glucocorticoïdes-Hsp, ce qui entraîne l'activation de protéines anti-inflammatoires au niveau du cytosol.

3.3.5 - Le rétrocontrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes

Le premier mécanisme de rétrocontrôle négatif se déroule via des mécanismes génomiques. Au niveau de l'hypothalamus (PVN), les glucocorticoïdes inhibent l'expression du CRF et de l'AVP (Conte-Delvox et al. 1992). Les effets combinés de la réduction des quantités d'ACTH, d'expression de CRF et d'AVP et de leurs récepteurs contribuent à la suppression de la réponse hormonale de stress de l'axe HPA. Ces effets passent principalement par les GR, mais probablement aussi par les MR (Armario 2006).

Au niveau de l'hypophyse antérieure, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de la POMC (Jacobson 2005; Sam & Frohman 2008), des récepteurs à CRF et à AVP des cellules corticotropes, influençant ainsi la quantité d'ACTH déversée dans la circulation (Tasker et al. 2006). L'hippocampe et le cortex médian pré-frontal seraient aussi impliqués dans le rétro-contrôle négatif de l'axe HPA par les glucocorticoïdes. En effet lors d'un stress chronique, la quantité de GR diminue dans ces zones et le rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes est atténué (Diorio et al. 1993; Mizoguchi et al. 2003).

Une suppression rapide non génomique de l'activation de l'axe HPA est également décrite, s'exerçant pour moitié par inhibition de la libération de l'ACTH dans l'hypophyse, et pour autre moitié dans le cerveau (Hinz & Hirschelmann 2000; Tasker et al. 2006). Au niveau du PVN, les glucocorticoïdes réduisent l'excitabilité des neurones projetant vers l'éminence médiane (Tasker et al. 2006), inhibent la libération d'AVP par ces neurones (Chen & Qiu 1999) et facilitent la libération GABA des neurones magnocellulaires (Tasker et al. 2006). L'intervention de récepteurs membranaires couplés aux protéines G (PKA et PKC) serait impliquée dans cette action rapide des glucocorticoïdes (Chen & Qiu 1999; Di et al. 2003; Tasker et al. 2006). Les MR seraient impliqués dans cette signalisation rapide, de manière indépendante des mécanismes transcriptionnels (Tasker et al. 2006).

#### **4) Stress et comportement**

Le stress serait responsable, chez l'Homme, de nombreux troubles psychiatriques tels que la dépression ou les troubles de l'anxiété (Barros et al. 2008; Bennett Ao 2008; Garcia-Bueno et al. 2008). Il tient également une part importante dans l'apparition des troubles alimentaires (Rojo et al. 2006; Torres & Nowson 2007; Lo Sauro et al. 2008; Ruggiero et al. 2008). Le stress peut aussi influencer l'agressivité (Barreto-Medeiros et al. 2007; Veenema & Neumann 2007). En effet, chez le Rat, des études expérimentales publiées récemment dans ce domaine montrent que l'application d'un stress tel qu'un choc électrique plantaire répété (Lamproglou et al. 2009) ou la malnutrition très tôt après la naissance (Barreto-Medeiros et al. 2007) augmente l'agressivité de animaux vis-à-vis de leurs congénères.

Le stress intervient dans les processus mnésiques et induit des effets complexes sur les fonctions cognitives (de Kloet et al. 1999). Différents travaux ont en effet montré que le stress peut faciliter les processus d'apprentissage et de mémorisation (Sandi et al. 1997; Cordero et al. 1998; Bowman et al. 2001; Bartolomucci et al. 2002; Li et al. 2007) ou au contraire induire des défauts des capacités mnésiques (Ohl & Fuchs 1999; Woodson et al. 2003; Zhang et al. 2003). Les effets du stress sur les processus d'apprentissage et de mémorisation semblent être dépendants du type de stress employé. En effet, le déclenchement d'un stress social lors de la mise en présence d'un rat avec un individu dominant (Touyarot et al. 2004) ou avec un prédateur (Sandi et al. 2005) se traduit par des défauts d'apprentissage dans un labyrinthe aquatique. Par ailleurs, un stress de contention appliqué pendant 7 jours à des rats n'induit aucun effet sur les performances dans un test de mémorisation spatiale. Par contre, 13 jours de contention induisent une augmentation des performances des animaux stressés (Luine et al. 1996). Un stress psychologique appliqué à des musaraignes n'induit aucun effet sur les capacités mnésiques des animaux (Bartolomucci et al. 2002).

#### **5) Aspects géniques du stress**

Suite à un stress, les glucocorticoïdes libérés vont se fixer sur leur récepteur (GR ou MR) et ainsi présenter, comme décrits précédemment, des effets génomiques et non génomiques. Les glucocorticoïdes entraînent donc une modulation de l'expression de certains gènes. Différents gènes tels qu'Hsp70 (Kagawa

& Mugiya 2002; Li et al. 2006) et NF- $\kappa$ B (Madrigal et al. 2002; Bierhaus & Nawroth 2003) sont considérés comme des marqueurs de stress. D'autres gènes, tels que l'Il-1, sont impliqués dans l'activation de l'axe HPA (Yirmiya et al. 2002; Goshen et al. 2003). Le stress peut également moduler l'expression de gènes impliqués dans le comportement tels que CamKII, BDNF et TrkB jouant un rôle important pour les processus d'apprentissage et de mémorisation (Koponen et al. 2004; Yamauchi 2005).

## **5.1- Propres au stress**

### 5.1.1 - Stress cellulaire et Heat Shock Proteins (Hsp)

La dénomination de protéines de choc thermique provient de leur découverte initiale à partir de cellules de glandes salivaires de drosophiles exposées à 37°C pendant 30 minutes (Ritossa 1962). Depuis, de nombreuses autres conditions d'induction ont été découvertes telles que des conditions physiologiques (division et différenciation cellulaires), pathologiques (infection virale ou bactérienne), environnementales (radiations) (Kiang & Tsokos 1998) et même des conditions de stress psychologique (Fukudo et al. 1995; Fukudo et al. 1997; Isosaki & Nakashima 1998; Kagawa & Mugiya 2002; Pizarro et al. 2003). Leurs nombreux stimuli d'induction conduisent à les qualifier de protéines de stress ; ces protéines Hsp sont donc considérées comme des marqueurs de stress majeur (Fukudo et al. 1997; Kagawa & Mugiya 2002; Li et al. 2006). Elles sont retrouvées dans la plupart des cellules, de la bactérie aux cellules de mammifère et abondent dans tous les compartiments subcellulaires. Leur structure hautement conservée dans la phylogénie leur confère un rôle fondamental pour la survie de l'organisme (Santoro 2000).

#### Les différentes familles d'Hsp

Il existe différentes familles d'Hsp se différenciant par leur taille, leur fonction, leur localisation (cytosolique, mitochondriale, nucléaire ou réticulaire) et leurs conditions d'expression (constitutives ou inductibles) (Kiang & Tsokos 1998; Kregel 2002).

La famille des Hsp70, la plus largement exprimée, est composée de protéines constitutives (Hsc70 cytoplasmique, Grp78 réticulaire et Grp75 mitochondriale) et/ou inductibles (Hsp70 nucléaire). Ces protéines possèdent une structure à deux domaines fonctionnellement liés, une extrémité amino-terminale avec une activité ATPase et une extrémité carboxy-terminale se liant aux peptides (Deocaris et al. 2006). Les Hsp70 inductibles sont codées par deux gènes (Hsp70-1 et Hsp70-2) localisés dans le complexe majeur d'histocompatibilité et leur homologie est telle que leurs produits ne sont pas distinguables (Huang et al. 2001). Une expression différentielle a toutefois été observée après une ischémie-reperfusion rénale chez le Rat avec un seuil d'activation plus bas pour la Hsp70-2 et une induction prépondérante de la Hsp70-1 lors d'une ischémie sévère (Akçetin et al. 1999).

Les Hsp70 inductibles possèdent de nombreuses fonctions : (i) elles se lient aux protéines immatures ou dénaturées assurant un rôle de « chaperon moléculaire », préservant ces protéines d'une mauvaise conformation, agrégation ou perte de fonction ; (ii) elles limitent la production de radicaux libres en

stimulant l'activité de la manganèse superoxide-dismutase mitochondriale (Suzuki et al. 2002) ; (iii) elles inhibent l'apoptose par leur interaction avec l'« apoptosis-inducing factor » (AIF) (Ravagnan et al. 2001), « apoptotic protease-activating factor-1 » (Apaf-1) (Beere et al. 2000; Saleh et al. 2000; Beere & Green 2001) et c-Jun N-terminal Kinase (JNK1) (Beere & Green 2001) ; (iv) elles jouent un rôle de transmetteur immunitaire du fait de leur sécrétion dans le milieu extracellulaire, passive par les cellules nécrosées (Basu et al. 2000) ou active par exocytose (Lancaster & Febbraio 2005). Ces Hsp circulantes se lient à des récepteurs spécifiques, incluant les Toll-like receptors (TLR) 2 et 4 (Asea et al. 2002) et induisent l'activation de la voie de signalisation du NF- $\kappa$ B (Nuclear factor- $\kappa$ B) par laquelle la transcription des cytokines est stimulée (Asea et al. 2002). Ainsi les Hsp70 intracellulaires constituent un rempart énergétiquement coûteux pour maintenir les cellules fonctionnelles alors que les Hsp70 extracellulaires constituent des signaux de danger (Pockley 2003).

### Rôle des Hsp

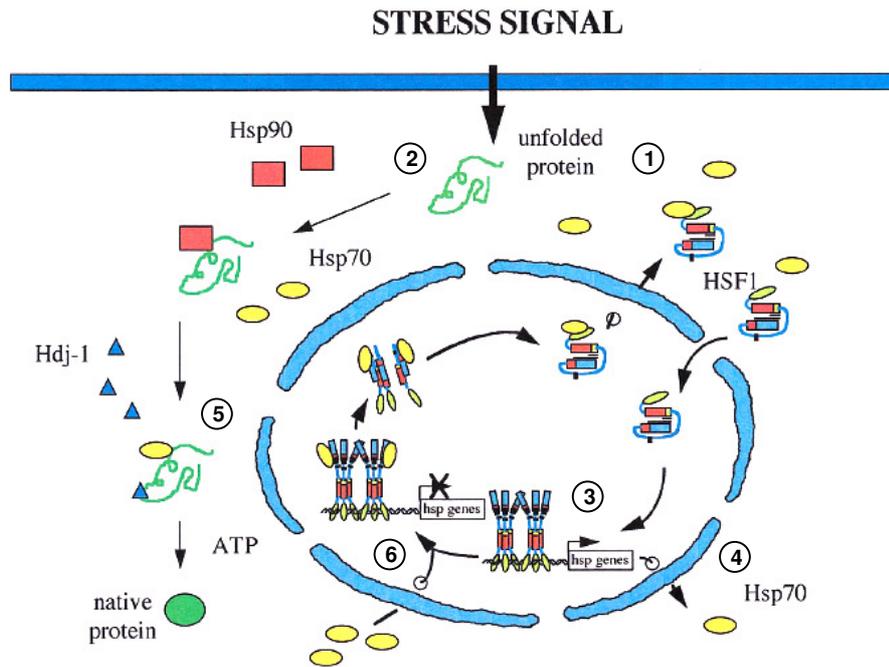
Dans les conditions basales, les Hsp présentent une activité commune de « chaperon moléculaire ». Dans des conditions de stress, la néosynthèse d'Hsp permet de faire face à l'augmentation des protéines dénaturées, ce qui implique un fort recrutement de ces protéines pour la prévention de l'agrégation et la dégradation des protéines endommagées. Cette réponse de « stress cellulaire » peut être considérée comme une réponse de survie visant au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la cellule (Feder & Hofmann 1999).

### L'induction des Hsp70 (pour revue, Santoro 2000)

Hsp70 est la forme inductible majeure des Hsp dont la synthèse est augmentée lors du stress jusqu'à devenir la protéine prépondérante de la cellule. Cette induction requiert des facteurs de transcription et se produit en réponse à toute agression provoquant la dénaturation des protéines, stimulus principal d'induction (**figure 17**).

L'induction des Hsp est médiée par quatre types de « Heat Shock Factor » (HSF1 à 4) régulés par divers signaux environnementaux et développementaux (Santoro 2000). Ces quatre HSF sont exprimés de manière constitutive et fonctionnent en coopération (Morimoto et al. 1996).

Dans les conditions basales, les Hsp70 sont liées aux HSF les maintenant ainsi sous une forme inactive (**figure 17, 1**). Les protéines dénaturées générées par l'agression tissulaire mobilisent les molécules chaperons Hsp70, qui se détachent des HSF (**figure 17, 2**). Le clivage Hsp70/HSF conduit à la phosphorylation des HSF par une protéine kinase C, formant ainsi des trimères HSF (**figure 17, 3**). Cette forme active migre ensuite dans le noyau et se lie au promoteur « Heat Shock Element » (HSE) du gène Hsp70 stimulant ainsi la transcription. Une augmentation massive d'ARNm de Hsp70 et de protéines Hsp70 se produit alors dans les cellules agressées (**figure 17, 4**). Les Hsp70 se lient aux protéines dénaturées pour restaurer leur structure tertiaire (**figure 17, 5**).



**Figure 17** : schéma simplifié de l'induction des Hsp70 (d'après Santoro 2000).

L'atténuation de l'expression des Hsp70 se produit lorsque la synthèse des Hsp70 excède les besoins générés par les protéines dénaturées. Les Hsp70 et d'autres « chaperons moléculaires » retournent dans le noyau pour se lier au domaine de transactivation transcriptionnelle des HSF1 et ainsi réduire la transcription des gènes Hsp (Voellmy & Boellmann 2007) (**figure 17, 6**). Les HSF4 sont considérés comme des régulateurs négatifs de la réponse au stress (Nakai et al. 1997). La dégradation des ARNm Hsp et des protéines Hsp constitue un autre moyen d'atténuation de la réponse : les ARNm Hsp70 contiennent, au niveau de la partie 3'-non codante, une région riche en bases A et U (ARE), sensible au turnover rapide des ARNm. La liaison de protéines sur cette séquence ARE protège les ARNm durant la phase de réponse aiguë. Puis, dans une phase plus tardive, la dégradation de ces protéines favorise le déclin des ARNm (Laroia et al. 1999).

### 5.1.2 - Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B

#### Activation de NF- $\kappa$ B

Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) est un facteur de transcription activé dans de nombreuses situations telles qu'un stress systémique, physique et/ou psychologique (Madrigal et al. 2002; Bierhaus & Nawroth 2003) ainsi que lors d'un stress cellulaire (lipopolysaccharide bactérien (LPS), cytokines, virus, radicaux libres) (Bauerle & Henkel 1994; Niu et al. 2003; Yamamoto & Gaynor 2004; Bowie & Hago 2005). Bien que les mécanismes exacts ne soient pas encore parfaitement identifiés, Hsp70 interfère avec l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. L'hypothèse émise tient au fait que les protéines Hsp ont un rôle de

protéines chaperons se liant aux sous-unités composant NF- $\kappa$ B ou à son inhibiteur lui même (I- $\kappa$ B), bloquant ainsi sa dégradation par le protéasome (Santoro 2000).

L'activation de cette voie tient un rôle crucial dans la réponse inflammatoire et immunitaire par ses actions modulatrices de l'expression génique.

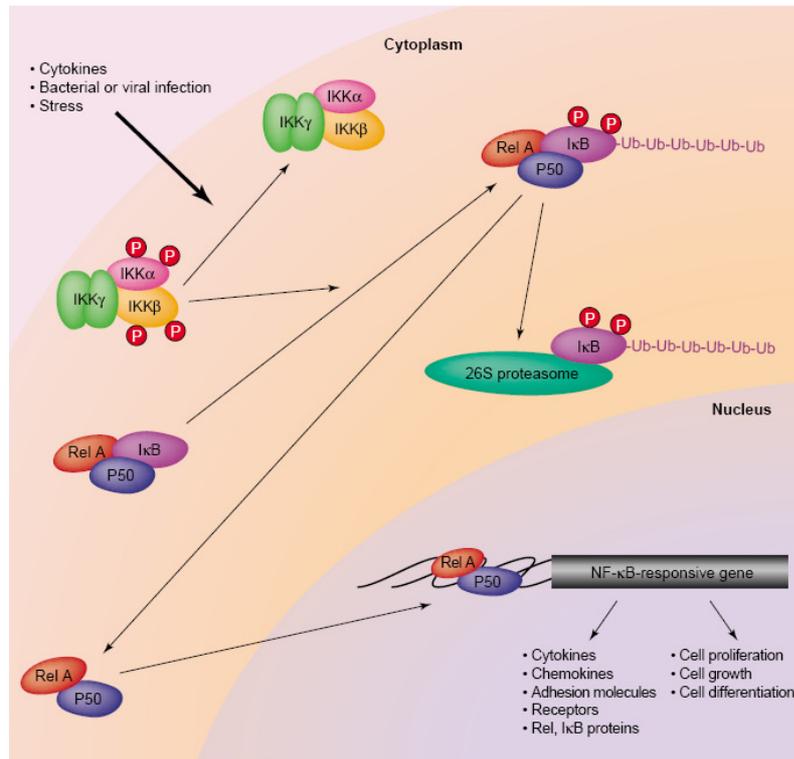
#### Mécanismes d'activation de NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription ubiquitaire comprenant 5 sous-unités monomériques : RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p50/p105) et NF- $\kappa$ B2 (p52/p100) et dont la dimérisation est nécessaire à sa liaison à l'ADN (Smoak & Cidlowski 2004). Différentes combinaisons des monomères peuvent se lier aux séquences  $\kappa$ B consensus sur le promoteur des gènes régulés par NF- $\kappa$ B, conduisant à l'activation transcriptionnelle. La forme de liaison classique et active est l'hétérodimère p65-p50 (Yamamoto & Gaynor 2004).

En l'absence de stimulation, les protéines NF- $\kappa$ B sont principalement localisées dans le cytoplasme, associées à une famille de protéines inhibitrices I $\kappa$ B (Baeuerle & Henkel 1994; De Bosscher et al. 2003) (**figure 18**). Cette association masque le site NLS de NF- $\kappa$ B empêchant ainsi sa translocation nucléaire. L'activité de NF- $\kappa$ B peut être stimulée par différents facteurs, précédemment cités. La stimulation des cellules par ces facteurs conduit à l'activation des I $\kappa$ B kinases qui phosphorylent I $\kappa$ B (Armstead et al. 1999). La phosphorylation de I- $\kappa$ B conduit à la liaison d'un complexe entraînant la poly-ubiquitinylation de I- $\kappa$ B et sa dégradation par le protéasome 26S. La protéine NF- $\kappa$ B libérée peut ainsi migrer dans le noyau (Yamamoto & Gaynor 2004). La translocation de NF- $\kappa$ B active la transcription de nombreux gènes inflammatoires dont ceux des cytokines telles que TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  et des enzymes associées à la synthèse de médiateurs inflammatoires tels que iNOS (Inducible nitric oxyde synthase) et COX-2 (Cyclo-oxygenase 2) (Smoak & Cidlowski 2004).

#### Gènes cibles de NF- $\kappa$ B

La voie de signalisation NF- $\kappa$ B constitue un des processus régulant le système immuno-inflammatoire. Parmi les gènes activés par cette voie, on distingue les cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, interféron- $\gamma$ ), les chémokines (IL-8), les macrophages, les molécules d'adhérence, des enzymes inductibles (COX-2 et iNOS) et certains récepteurs impliqués dans la reconnaissance immunitaire (MHC, complexe majeur d'histocompatibilité) (Yamamoto & Gaynor 2004). Le promoteur du gène I $\kappa$ B $\alpha$  contient aussi des sites de liaison NF- $\kappa$ B (Ito et al. 1994).



**Figure 18** : mécanisme d'activation du facteur de transcription NF-κB (d'après Yamamoto & Gaynor 2004).

### Répression de l'activité NF-κB par les glucocorticoïdes

L'inhibition de l'activité NF-κB représente un mécanisme important par lequel les glucocorticoïdes exercent leurs effets anti-inflammatoires (D'Acquisto et al. 2002; Delhalle et al. 2004). Cet effet passe par plusieurs mécanismes : (i) les récepteurs aux glucocorticoïdes (MR comme GR) répriment l'activité transcriptionnelle de NF-κB grâce à des interactions avec la sous-unité p65. Ceci prévient la formation de dimères p65-p50 actifs (Scheinman et al. 1995; Heck et al. 1997) ; (ii) Le complexe glucocorticoïdes-GR réprime la transcription médiée par NF-κB (D'Acquisto et al. 2002; Lehmann et al. 2002). De ce fait, l'expression de certaines cytokines inflammatoires tels que TNFα et Il-1 (Scheinman et al. 1995) est inhibée.

Outre Hsp70 et NF-κB, d'autres molécules telles que l'interleukine 1 interviennent dans la régulation de la réponse au stress. En effet, cette molécule contribue à l'activation de l'axe HPA (Yirmiya et al. 2002; Goshen et al. 2003).

### 5.1.3 - La cytokine Il-1

#### Généralités

Les cytokines sont produites par les cellules du système immunitaire en périphérie mais également par les cellules gliales et les neurones au niveau du cerveau (Dinarello 1996; Szelenyi 2001).

La signalisation Il-1 est médiée par un système complexe incluant différents ligands et récepteurs. Les cytokines Il-1 $\alpha$  et Il-1 $\beta$  activent la voie de signalisation alors que Il-1ra, antagoniste de l'Il-1 bloque les effets de l'Il-1 (Dinarello 1994). Différents récepteurs à l'Il-1 ont été identifiés (Loddick et al. 1998). Le récepteur de type 1, Il-1R1, semble, à l'heure actuelle, impliqué dans la transmission de toutes les fonctions biologiques de l'Il-1. Le récepteur de type 2 présente une action antagoniste sur la signalisation Il-1 (Dinarello 1996; Sims 2002). La signalisation Il-1 peut être médiée par différentes voies de signalisation incluant les MAPK, la voie NF-kB ainsi que la translocation de facteurs de transcription dans le noyau (McCulloch et al. 2006).

### Stress et Il-1

Différents travaux se sont intéressés à la relation existant entre le stress et l'Il-1. Lors d'un stress, cette cytokine intervient dans la modulation de la réponse de l'axe HPA via différents mécanismes. En effet, elle induit la sécrétion de CRF au niveau du PVN de l'hypothalamus (Sapolsky et al. 1987; Goshen & Yirmiya 2008). L'Il-1 intervient également au niveau de l'hypophyse, structure dans laquelle des récepteurs Il-1R1 sont présents (Turnbull & Rivier 1999; Goshen & Yirmiya 2008). Enfin l'Il-1 stimule directement la sécrétion de glucocorticoïdes par les glandes surrénales, bien qu'aucun récepteur n'ait été identifié à ce niveau (Turnbull & Rivier 1999; Goshen & Yirmiya 2008).

La réponse au stress étant diminuée suite à l'altération de la voie de signalisation de l'Il-1 (Wolf et al. 2007), cette cytokine apparaît comme un régulateur important de la réponse au stress. Cependant, le stress peut également moduler l'expression de cette cytokine. Ainsi, chez la Souris, un stress d'immobilisation (Shintani et al. 1995) ou un choc plantaire (O'Connor et al. 2003) augmentent l'activité Il-1 au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe.

Il semble cependant que les effets du stress sur l'expression cérébrale d'Il-1 dépendent de la nature et de l'intensité du stimulus. Ainsi, la combinaison de plusieurs stress augmente l'expression d'Il-1 au niveau de l'hypothalamus alors qu'un stress seul n'induit pas cet effet (Deak et al. 2005). Au contraire, un stress chronique induit une baisse de l'expression d'Il-1 $\beta$  dans l'hippocampe de souris (Bartolomucci et al. 2003). Les auteurs émettent l'hypothèse qu'une augmentation des taux plasmatiques de corticostérone serait responsable de la baisse de la régulation des transcrits au niveau cérébral. Cette hypothèse est par ailleurs étayée par différents travaux montrant que les glucocorticoïdes inhibent la transcription d'Il-1 dans des cellules immunitaires (Knudsen et al. 1987; Lew et al. 1988; Amano et al. 1993).

Les interactions existant entre la cytokine Il-1 et l'axe HPA sont bidirectionnelles puisque les glucocorticoïdes suppriment la production d'Il-1 via différents mécanismes : (i) en diminuant la transcription de l'Il-1 et en déstabilisant les ARNm ( Lee et al. 1988; Amano et al. 1993) et (ii) en bloquant la synthèse protéique d'Il-1 via l'AMPc (Knudsen et al. 1987). Différents travaux ont montré cet effet inhibiteur des glucocorticoïdes sur l'expression de l'Il-1. Ainsi des animaux stressés par un choc plantaire

juste après une injection de LPS présentent, au niveau de l'hypophyse, de l'hypothalamus et de l'hippocampe, des taux d'Il-1 $\alpha$  et  $\beta$  plus faibles que les animaux non stressés (Goujon et al. 1995).

Par ailleurs, l'expression d'Il-1 contribue à la régulation des processus mnésiques au niveau de l'hippocampe de Rat (Depino et al. 2004) et de Souris (Avital et al. 2003).

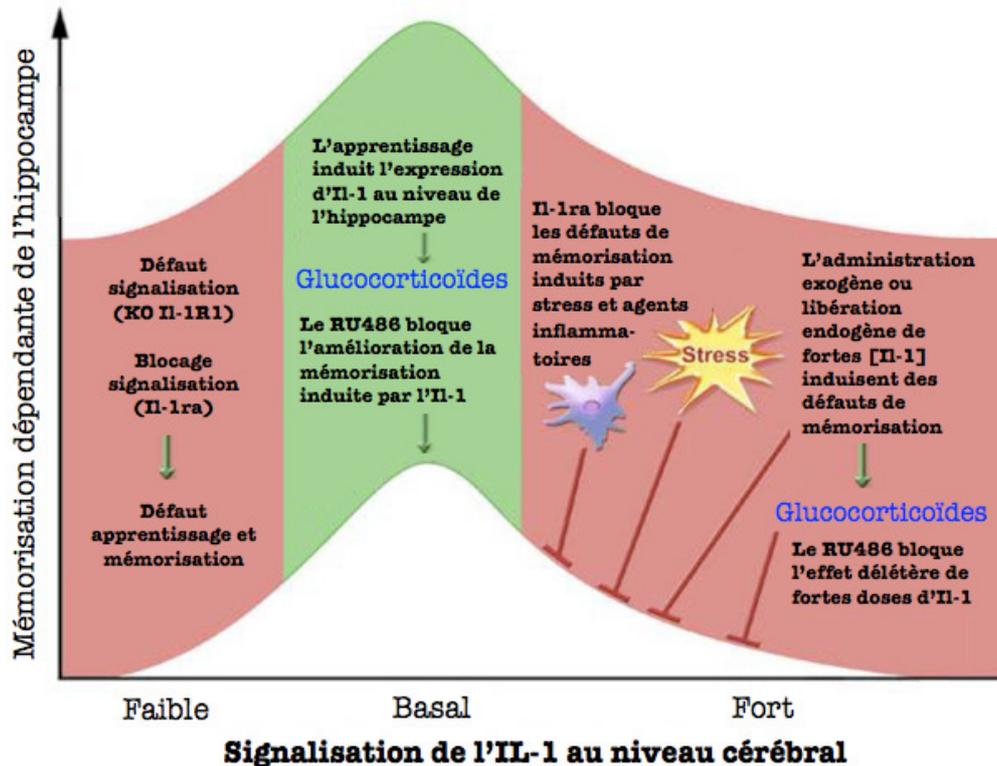
## **5.2- Gènes et modulation de la mémorisation par le stress**

### **5.2.1 - Il-1 et mémorisation**

Les récepteurs de l'Il-1 sont présents au niveau de nombreuses structures cérébrales (Cunningham & De Souza 1993; Loddick et al. 1998; Goshen & Yirmiya 2008) et la plupart des effets d'une administration périphérique d'Il-1 sont bloqués par l'injection de son antagoniste Il-1ra dans le cerveau (Dinarello 1996; Rothwell & Luheshi 2000). L'Il-1 pourrait ainsi présenter des effets neurophysiologiques et comportementaux via son action au niveau cérébral.

Suite à son rôle dans la sécrétion des glucocorticoïdes lors d'un stress, l'Il-1 a été suspectée de jouer un rôle dans la régulation des processus d'apprentissage et de mémorisation. Ainsi, de nombreux travaux ont montré les effets délétères de fortes doses d'Il-1 $\alpha$  ou  $\beta$  sur la mémorisation de rats (Barrientos et al. 2004; Depino et al. 2004; Goshen & Yirmiya 2008). Il apparaît que le blocage du récepteur Il-1R1 (Yirmiya et al. 2002), son absence chez les animaux KO pour ce récepteur (Goshen et al. 2000; Goshen et al. 2001) ainsi qu'une administration élevée de la cytokine (Oitzl et al. 1993; Gibertini et al. 1995) diminuent les capacités d'apprentissage lors d'un test de labyrinthe aquatique. Cependant d'autres équipes ont démontré le rôle bénéfique d'une concentration basale d'Il-1 pour les processus mnésiques en utilisant des approches génétiques comme pharmacologiques (Yirmiya et al. 2002; Avital et al. 2003; Goshen et al. 2007; Goshen & Yirmiya 2008). Le rôle bénéfique de l'Il-1 sur les processus de mémorisation a également été montré par l'induction de l'expression de cette cytokine dans l'hippocampe lors de tests d'apprentissage (Depino et al. 2004; Goshen et al. 2007). Il a été montré que l'Il-1 $\alpha$  endogène module l'apprentissage chez des rats adultes (Depino et al, 2004) et que l'administration d'Il-1 $\alpha$  à des nouveaux-nés provoque des défauts mnésiques à l'âge adulte (Tohmi 2004).

L'influence de l'Il-1 sur la mémorisation peut donc être modélisée comme une courbe en « cloche » ; des taux physiologiques de la cytokine sont nécessaires pour les processus d'apprentissage et de mémorisation alors qu'une privation ou un excès d'Il-1 se traduit par des défaut des capacités mnésiques (**figure 19**) (Goshen et al. 2007; Goshen & Yirmiya 2008). La limite entre ces deux effets antagonistes varie selon le test employé (Yirmiya et al. 2002). De même, les effets des glucocorticoïdes sur la mémoire présentent un profil identique (Diamond et al. 1992). Ainsi, à des taux élevés, les glucocorticoïdes apparaissent délétères pour la mise en place de la mémorisation alors qu'à des concentrations physiologiques, ils facilitent la mémorisation (de Kloet et al. 1999; de Kloet et al. 2005).



**Figure 19** : représentation schématique des effets de l'IL-1 et des glucocorticoïdes sur les processus mnésiques (d'après Goshen & Yirmiya 2008).

Outre l'IL-1, d'autres molécules interviennent dans les processus de mémorisation.

### 5.2.2 - La voie CamKII/BDNF/TrkB

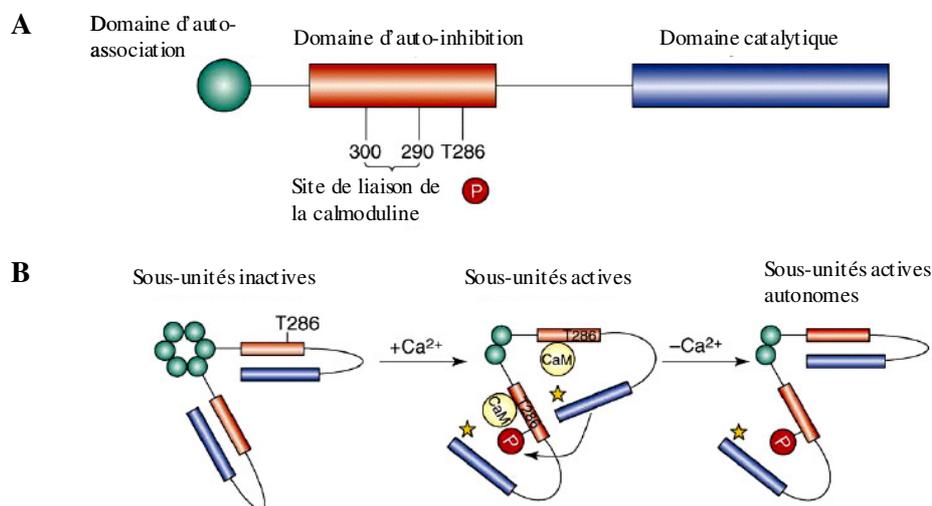
#### La calcium-calmoduline Kinase II (CamKII)

De nombreuses fonctions physiologiques dépendent des variations des taux calciques intracellulaires. Certaines protéines intracellulaires, telle que la calmoduline (CaM), se lie au calcium et transmettent alors les réponses physiologiques faisant suite à l'influx calcique. La liaison du calcium induit un changement de conformation de la CaM, exposant alors des résidus hydrophobes pouvant interagir avec de nombreuses protéines cibles. Parmi les protéines de signalisation régulées par le complexe  $Ca^{2+}/CaM$ , on distingue une famille de protéines à Ser/Thr appelée « calcium calmodulin kinase » ou CamK (Colbran 2004). Ces CamK sont activées en présence de calcium et de calmoduline. Une fois actives, elles peuvent phosphoryler les résidus sérine et thréonine de leurs substrats. Parmi les différentes CamK, la seconde protéine kinase calcium/calmoduline dépendante éluee sur une colonne à partir d'une fraction d'extrait cytosolique de cerveau de rat a été appelée CamKII (Yamauchi & Fujisawa 1980).

Chez les mammifères, CamKII comprend une famille de quatre isoformes codées par 4 gènes distincts :  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , et  $\delta$  subissant différents épissages alternatifs (Colbran & Brown 2004; Irvine et al. 2006).

Ces quatre isoformes sont hautement conservées chez les mammifères. L'enzyme est constituée d'un ensemble oligomérique d'une ou plusieurs sous-unités (Hudmon & Schulman 2002; Colbran & Brown 2004). Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  sont exclusivement exprimées au niveau du SNC. CamKII $\alpha$ , essentiellement restreinte aux neurones présentant des synapses excitatrices (Hudmon & Schulman 2002), est la principale isoforme retrouvée au niveau de l'hippocampe (Hudmon & Schulman 2002; Irvine et al. 2006).

CamKII comprend trois régions : (i) un domaine catalytique N-Terminal fortement conservé; (ii) un domaine régulateur et (iii) un domaine C-Terminal d'« auto-association ». Le domaine d'auto-association est nécessaire pour la formation d'une holoenzyme constituée de différentes sous-unités (Rosenberg et al. 2005). Le domaine régulateur comprend une région auto-inhibitrice, une région de liaison à la calmoduline et plusieurs sites d'auto-phosphorylation (Thr 286, Thr 305/306) (**figure 20 A**). Le domaine auto-inhibiteur possède la propriété de réguler l'activité de la kinase.



**Figure 20** : **A**- représentation schématique de la structure de CamKII $\alpha$  ; **B**- représentation schématique de l'activation de CamKII $\alpha$  par la calmoduline (d'après Irvine et al. 2006).

Dans des conditions basales, la kinase est inactive puisque le domaine auto-inhibiteur est lié au site catalytique (**figure 20 B**) (Irvine et al. 2006).

En présence de calcium, la CaM se lie à CamKII induisant un changement de conformation de la kinase. Le domaine catalytique de CamKII devient alors accessible (**figure 20B**) ; la kinase est ainsi activée. Lors de ce stade « actif », le résidu Thr<sup>286</sup> du domaine auto-inhibiteur peut être phosphorylé par les sous-unités voisines de l'holoenzyme (Hanson et al. 1994; Mukherji & Soderling 1994). Cette « auto-phosphorylation » empêche la kinase de retourner à un stade inactif, même si les taux calciques diminuent ou que la calmoduline se dissocie de la CamKII (Lisman et al. 2002).

CamKII présente de nombreux substrats, phosphorylant un grand nombre de protéines cérébrales. Elle intervient de ce fait dans de nombreuses fonctions telles que la synthèse et l'exocytose de

neurotransmetteurs, la modulation de l'activité des canaux ioniques, le transport cellulaire, la morphologie cellulaire, la plasticité synaptique, l'apprentissage et la mémorisation et l'expression génique (Hudmon & Schulman 2002; Lisman et al. 2002).

### BDNF/TrkB

Le BDNF, brain-derived neurotrophic factor, appartient à la super-famille des neurotrophines dont font partie le NGF (Nerve Growth Factor) ainsi que les neurotrophines NT-3 et NT-4 (Leibrock et al. 1989). Les neurotrophines sont impliquées dans la régulation de la différenciation, la croissance et la survie des neurones (Lu et al. 2008).

Le BDNF est une petite protéine dimérique dont la signalisation fait suite à son interaction avec son récepteur de haute affinité TrkB (tropomyosin related kinase) (Heumann 1994; Lu et al. 2008). Le BDNF comme son récepteur sont largement distribués dans l'hippocampe (Bramham & Messaoudi 2005). Des vésicules de sécrétion contenant le BDNF sont présentes au niveau des terminaisons axonales pré et post-synaptiques des principaux neurones glutamatergiques (Lessmann et al. 2003; Lu 2003). Le BDNF est sécrété de façon indépendante du  $Ca^{2+}$  via l'activation des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) ou de façon dépendante par des canaux calciques voltage-dépendants (Lever et al. 2001; Aicardi et al. 2004). Il peut également être sécrété à partir des neurones pré-synaptiques par un mécanisme impliquant la mobilisation de calcium à partir de stocks intracellulaires (Balkowiec & Katz 2002). Une fois sécrété dans la fente synaptique, le BDNF se lie à TrkB situé aussi bien au niveau des neurones pré que post-synaptiques de synapses glutamatergiques (Drake et al. 1999). La liaison du BDNF sur son récepteur conduit à la dimérisation du récepteur et à l'auto-phosphorylation des résidus Tyr des domaines intracellulaires du récepteur. Ce phénomène induit l'activation de voies de signalisation cytoplasmiques dont celles de la MAPK, de la PLC et de la PI3K (Kaplan & Miller 2000).

La voie de signalisation BDNF/TrkB est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Yamada & Nabeshima 2003).

### Implication de CamKII, BDNF/TrkB lors des processus de mémorisation

L'utilisation de rats et de souris knock-out pour la sous-unité  $\alpha$  de CamKII a permis d'étudier le rôle physiologique de cette protéine *in vivo*. Ces animaux présentent des perturbations de l'apprentissage mais également de la mémorisation (Silva et al. 1992; Blanquet & Lamour 1997; Deak 2007). De façon similaire, des souris dont le site d'auto-phosphorylation de la protéine est supprimé par la substitution de la thréonine par l'alanine présentent des perturbations de l'apprentissage spatial (Giese et al. 1998). Par ailleurs, des manipulations pharmacologiques et génétiques montrent l'importance de CamKII (Silva et al. 1992; Cho et al. 1998; Giese et al. 1998) et du BDNF (Yamada & Nabeshima 2003) pour la mémoire. La délétion génétique de CamKII se traduit par des défauts d'apprentissage (Cho et al. 1998). De plus ces

deux molécules sont importantes pour le développement de la mémoire chez l'Homme (de Quervain & Papassotiropoulos 2006; Hashimoto et al. 2008).

Différents travaux se sont attachés à l'étude, *in vivo*, des effets de BDNF sur la mémorisation. Ces résultats mettent en exergue une forte corrélation entre l'expression des ARNm de BDNF et les performances comportementales lors de tests d'apprentissage et de mémorisation (Schaaf et al. 2001; Tyler et al. 2002; Yamada et al. 2002). Une augmentation de l'expression d'ARNm codant pour le BDNF, 15 min après stress a ainsi été observée au niveau de l'hypothalamus (Givalois et al. 2004). Il semble que le nombre de neurones exprimant des taux élevés de BDNF dans l'hippocampe corrèle avec la réussite de l'apprentissage (Chen et al. 2007).

Afin d'identifier la relation existant entre l'apprentissage et le BDNF, des études génétiques comme pharmacologiques de privation de BDNF ou de TrkB ont été réalisées. Des souris mutantes hétérozygotes pour le BDNF (Linnarsson et al. 1997) ainsi que le traitement par des anticorps dirigés contre le BDNF (Mu et al. 1999) provoquent des défauts de l'apprentissage dans un labyrinthe aquatique. Par ailleurs, le BDNF est une molécule clé impliquée dans la persistance des processus de mémorisation (Bekinschtein et al. 2008).

Le lien existant entre les trois gènes CamKII/BDNF/TrkB n'est, à l'heure actuelle, pas clairement établi. Ainsi, au niveau de l'hippocampe, l'activation de CamKII est augmentée par le BDNF (Blanquet & Lamour 1997; Gomez-Pinilla et al. 2007) et la liaison du BDNF sur son récepteur TrkB active CamKII (Minichiello et al. 2002). Cependant d'autres études montrent que l'activation de CamKII conduit à l'expression de l'ARNm de BDNF (Kolarow et al. 2007; Vaynman et al. 2007). Le mécanisme d'activation de ces trois gènes reste encore inconnu, l'hypothèse d'une boucle de régulation entre ces trois gènes a été évoquée.

*En résumé, la PB est une molécule qui présente une toxicité faible lorsqu'elle est administrée à la dose préconisée dans le cadre du pré-traitement en cas de menace chimique. Suite à son utilisation en tant que traitement prophylactique durant le conflit du Golfe, les principaux troubles décrits par les vétérans sont liés à une hyperactivation du système cholinergique périphérique. Cependant l'analyse de la bibliographie montre que les effets centraux de la prise de PB lors d'un évènement stressant ne sont pas bien établis. Dans le même temps, les preuves d'un effet de la PB au niveau du SNC s'accumulent lors de sa prise combinée avec celle d'autres composés chimiques ou avec le stress. En effet, certains symptômes décrits par les vétérans tels que les troubles mnésiques, l'irritabilité, l'anxiété ou les sautes d'humeur pourraient être liés à l'action combinée de la PB avec d'autres composés chimiques ou avec le stress et leurs conséquences au niveau du SNC.*

*Considérant la place prépondérante du système cholinergique dans le fonctionnement du système nerveux central et périphérique, les effets secondaires possibles consécutifs à la prise répétée de PB chez les vétérans apparaissent comme un point important à éclaircir. Durant le conflit, les soldats ont été*

*soumis à un stress aussi bien physique que psychologique. Pourtant, il existe peu d'études relatives aux effets comportementaux et moléculaires consécutifs à l'administration de PB en situation de stress.*

*Afin de remédier à ces lacunes et de tenter d'expliquer certains troubles décrits par les vétérans, nous avons choisi d'évaluer les conséquences comportementales, histologiques et moléculaires à moyen comme à court terme, de l'administration répétée de PB dans des conditions de stress.*



# **METHODOLOGIE**

**- MATERIELS ET METHODES -**



## Matériels et Méthodes

### 1) Animaux

Toutes les expérimentations ont été réalisées sur des rats Wistar mâles adultes. Ce modèle a été choisi en raison d'une abondante littérature scientifique sur cet animal, en particulier dans le domaine comportemental, et des résultats préalablement acquis par le laboratoire concernant les effets centraux de la pyridostigmine associée au stress.

Les animaux proviennent de l'élevage Harlan (France). Ils sont livrés à l'âge de 11 semaines (poids moyen 300-325 g) dans l'animalerie, où ils sont hébergés tout au long de l'expérimentation. Dès leur arrivée, ils sont répartis au hasard à raison de 4 animaux par cage. Pour chaque expérimentation (décrite ultérieurement), les cages sont réparties au hasard en 4 lots de même effectif :

- Lot sham-solvant : animaux non stressés et non traités (excepté l'administration orale par « gavage » avec de l'eau) ;
- Lot sham-PB : traitement répété par la pyridostigmine seule ;
- Lot stress-solvant: stress répété seul ;
- Lot stress-PB : traitement répété par la pyridostigmine associé au stress.

La stabulation des animaux se fait dans une animalerie dédiée aux rongeurs, dont l'ambiance est contrôlée (température ambiante :  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , humidité relative :  $45 \pm 10\%$ , bruit blanc inférieur à 50 dB). Le cycle d'éclairage (8h-20h) est lui aussi contrôlé. La nourriture et la boisson sont accessibles *ad libitum*.

L'expérimentation débute lorsque les animaux sont âgés de 13 semaines, soit 2 semaines après la livraison en vue d'une habitude aux nouvelles conditions d'hébergement et de la construction d'une structuration sociale. Les animaux sont alors pesés quotidiennement.

### 2) Traitement par la pyridostigmine

Le bromure de pyridostigmine (PB : 3-diméthylaminocarbonyloxy-N-méthylpyridinium Bromide) provient de chez Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Après ouverture du flacon, celui-ci est conservé dans un dessiccateur maintenu sous vide.

Après dilution extemporanée dans de l'eau courante, la pyridostigmine est administrée une fois par jour à la dose de  $1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Les animaux "solvant" reçoivent le même volume d'eau courante. Le traitement est administré par voie orale (par « gavage ») à l'aide d'une canule 30 minutes avant le début de la séance de stress (ou son simulacre dans l'enceinte servant pour le stress sans application du choc électrique). Ces conditions expérimentales ont été choisies afin de simuler la prise répétée de

pyridostigmine par les combattants placés en situation d'alerte chimique. Comme nous le verrons dans la partie « résultats », cette posologie permet l'inhibition d'environ 30 à 40 % de l'activité cholinérasique sanguine chez le Rat ; cette inhibition est donc similaire à celle recommandée par l'OTAN lors de l'utilisation de la PB comme pré-traitement contre une éventuelle intoxication par les neurotoxiques organophosphorés.

### **3) Modèle de stress répété**

Notre modèle de stress répété est basé sur un test d'évitement actif locomoteur au son, connu sous le nom de « pole-climbing » avoidance, ou PCA (Le Poncin-Lafitte et al. 1982). Dans sa version de base, ce test est utilisé comme test d'apprentissage et n'induit pas de stress chez l'animal. Dans notre étude, ce test a été modifié en augmentant le nombre d'essais par séance (25 au lieu de 10) et le nombre de séances (10 au lieu de 5). Comme nous le montrerons dans la partie « résultats », ces modifications conduisent le rat à développer un état de stress caractérisé par un comportement impulsif et craintif pouvant être considéré comme de l'« l'anticipation à tout prix ».

Le PCA est réalisé en 10 séances sur 12 jours, de J1 à J5 puis de J8 à J12, chaque séance quotidienne étant limitée à une durée fixe de 25 minutes. Le rat est placé dans une cage à parois transparentes (34 x 23 x 42 cm ; Bionic Instruments, Paris, France) au centre de laquelle est suspendue une tige de bois (ou mât) (longueur 32 cm, 3 cm de diamètre). Le sol de la cage est recouvert d'une grille qui peut transmettre un choc électrique. Un dispositif électronique permet le contrôle de chaque essai correspondant à un cycle. Chaque essai d'une durée d'une minute comprend :

- une phase de repos de 40 secondes ;
- un stimulus auditif correspondant à un son (300 Hz) durant 4 secondes ;
- un intervalle de repos d'une seconde ;
- un choc électrique (1 mA) durant 15 secondes.

Un essai, correspondant à un cycle, est comptabilisé dès lors que le son est délivré. Chaque séance de PCA durant 25 minutes et un essai durant 1 minute, un nombre maximal de 25 essais peut être observé lors de ce test. Cependant, le rat peut échapper au choc électrique en montant sur la tige de bois. Chaque fois que le rat s'agrippe au mât, le programme s'arrête et se réinitialise lorsque le rat redescend. L'application de ce test permet donc l'observation de différentes réponses :

- le rat entend le son mais ne monte pas sur le mât. Il reçoit donc le choc électrique pendant 15 secondes. L'essai est comptabilisé et un nouvel essai débute avec la phase de repos ;
- le rat entend le son et reçoit le choc électrique pendant quelques secondes avant de monter sur le mât. L'essai est comptabilisé et un nouvel essai démarre dès que le rat descend du mât ;
- le rat monte sur le mât dès qu'il entend le son, puis redescend. L'essai est comptabilisé ;

- après quelques sessions, le rat monte et descend du mât à tout moment. Chaque fois que le rat monte sur le mât avant le son, le programme s'arrête et redémarre dès que le rat descend. L'essai n'est pas comptabilisé tant que le rat monte sur le mât avant que le son soit délivré. Ainsi lors de ce test PCA modifié, une diminution du nombre d'essais reflète le stress de l'animal.

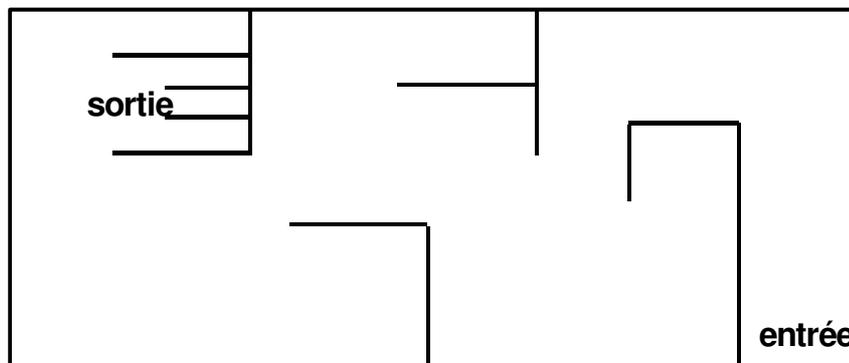
Durant ce stress répété, les animaux mémorisent parfaitement le contexte. En effet, lorsqu'ils sont replacés dans l'enceinte servant pour le test, même des semaines ou des mois après la dernière séance, les animaux s'agrippent immédiatement à la tige de bois sans que soient délivrés ni son, ni choc électrique.

#### **4) Test du water-maze ou labyrinthe aquatique**

Ce test vise à étudier les capacités d'apprentissage et de mémorisation des animaux, afin d'associer pour chaque animal les anomalies neuropathologiques éventuellement observées à la réalité des troubles cognitifs.

Le test retenu fait appel à la capacité d'orientation visuo-spatiale des rats afin de sortir de l'eau (**figure 21**) ; il est pratiqué dans un container en Plexiglas® opaque (120 x 55 x 40 cm) rempli d'eau tiède (25°C) à 27 cm de hauteur. Le test se déroule en cinq jours consécutifs (J15 à J19) à raison d'une séance par jour. Le temps maximum imparti à chaque animal pour sortir de l'eau est de 180 secondes. En cas d'échec, le rat est sorti de l'eau par l'expérimentateur. Le nombre d'erreurs d'orientation et le temps de parcours sont enregistrés. Après chaque séance, les animaux sont placés dans une enceinte chauffante afin de les sécher.

Lors de nos expérimentations, le test du water-maze est systématiquement précédé d'une séance de rappel du contexte stressant en plaçant les rats pendant deux minutes dans la cage du « pole-climbing test » sans déclencher le choc électrique.



**Figure 21** : schéma du labyrinthe aquatique

## **5) Prélèvements des échantillons biologiques**

### **5.1- Prélèvements d'échantillons sanguins**

Les échantillons sanguins sont destinés à la détermination de la corticostéronémie, de l'aldostéronémie et de l'activité cholinestérasique (ChE).

Après prélèvement intracardiaque ou après sacrifice des animaux par décapitation, le sang est collecté sur tube hépariné. Un aliquot de sang total est dilué au dixième dans de la saponine 1%, ceci afin d'assurer l'hémolyse des globules rouges et une bonne conservation à -80° C. Les dilutions sont immédiatement placées dans l'azote liquide puis transférées à -80°C jusqu'à l'analyse. Cet échantillon est destiné à la mesure des activités ChE et AChE sanguines.

Le reste du sang est centrifugé et des aliquots de plasma sont conservés à -80°C jusqu'au dosage de la corticostérone et de l'aldostérone.

### **5.2- Prélèvements des structures cérébrales**

A la fin du protocole, les rats sont euthanasiés par décapitation. Les cerveaux sont rapidement extraits de la boîte crânienne et placés sur un support en aluminium en contact avec de la glace (4°C environ). Différentes structures cérébrales sont ensuite prélevées par microdissection à l'aide de disséqueurs en verre : hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex frontal. Toutes les structures cérébrales, hors hypothalamus, sont séparées en deux lots d'échantillons (correspondant aux hémisphères droit et gauche). Entre chaque rat, les disséqueurs sont rincés à l'eau PPI, essuyés à l'aide d'une compresse stérile puis passés au stérilisateur à billes.

Les structures droites, destinées aux mesures de ChE, sont placées dans des tubes Eppendorf® étiquetés et immédiatement congelées dans l'azote liquide puis placées à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les structures gauches et l'hypothalamus, destinés au dosage des ARNm par RT-PCR, sont déposés, après dissection, dans un tube Eppendorf® stérile préalablement taré et contenant 500 µL de RNAlater (Ambion, Courtaboeuf, France). Les échantillons doivent être inférieurs à 5 mm d'épaisseur afin d'assurer une bonne pénétration du RNAlater dans les tissus et ainsi une protection optimale des échantillons. En effet, les ARN sont des structures particulièrement fragiles et rapidement dégradées. Les tubes sont ensuite placés à 4°C pendant 24 heures (au maximum) puis pesés avant d'être stockés à -20°C en attente de l'extraction des ARN.

### **5.3- Prélèvements des cerveaux fixés**

Au préalable, durant le dernier jour du labyrinthe aquatique, les animaux reçoivent deux injections *i.p.* de BrdU (bromodéoxyuridine ; Sigma, France) (50 mg/kg). La BrdU est un nucléotide analogue de la thymidine qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en phase S de prolifération. Cette administration est destinée à la mesure de la prolifération cellulaire par détection immunohistologique. La BrdU est extemporanément diluée dans du NaCl 0,9%.

Pour les techniques immunohistologiques réalisées sur coupes de tissus, il est nécessaire de figer la structure des tissus. L'étape de fixation permet d'immobiliser les molécules *in situ* (en particulier les antigènes) et de préserver l'aspect structural du tissu. Elle est réalisée *in vivo* par utilisation de formol acétique (4% final) puis de formol salin pour la post-fixation, selon le protocole décrit, succinctement, ci-dessous.

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital sodique (Ceva Santé Animale, France) administré par voie intrapéritonéale (1µL/g), puis perfusés par voie intracardiaque par du sérum physiologique hépariné (héparine Choay® 5000 U/mL final) au débit de 25 mL/min, afin de laver le cerveau de toutes traces de sang avant la fixation et ainsi d'éviter le dépôt de caillots sanguins au niveau cérébral. Le formol acétique 4% est perfusé en intracardiaque à raison de 100 mL pour 100 g de rat à un débit de 25 mL/min.

Le cerveau est ensuite délicatement extrait de la boîte crânienne en s'assurant d'éliminer soigneusement les méninges. Il est ensuite immergé dans du liquide de post-fixation (formol salin) pendant 6 à 24 heures.

### **6) Dosage des ARNm par PCR quantitative**

Cette technique comprend différentes étapes qui sont : l'extraction des ARN messagers, la transcription inverse puis la PCR en temps réel.

#### **6.1- Extraction des ARN messagers (ARNm) par le MagNApure**

Les prélèvements cérébraux sont retirés du RNAlater et placés dans un tampon de lyse contenant du thiocyanate de guanidine (RLT buffer, Qiagen, Courtaboeuf, France) à une concentration de 200 mg de tissu par millilitre de tampon. Après ajout de deux billes de carbure de tungstène dans chaque tube, l'échantillon est broyé à l'aide du broyeur à billes MM300 (Rescht, Haa, Allemagne) pendant 150 secondes à 30 Hz. Les lysats obtenus sont ensuite placés à -80°C en attente de l'extraction des ARNm.

L'extraction est effectuée par l'automate MagNApure® (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) à l'aide d'un kit d'extraction (Isolation kit II tissue) à partir de 40 µL de lysat (soit 8 mg de tissu). Un volume final de 50 µL contenant les ARNm est élué puis stocké à 4°C.

L'extraction est basée sur l'utilisation de la queue poly-A pour identifier les ARNm. Après broyage du tissu, les ARNm libérés dans le lysat sont mis en présence d'oligodéoxythymidine (oligo(dT)) complexés à de la biotine. Les oligo(dT), oligonucléotides comprenant 6 T, vont se fixer de façon complémentaire aux poly-A présents en 3' de l'ARNm. L'échantillon est ensuite incubé en présence de billes magnétiques complexées à la streptavidine (SMPs). La liaison biotine-streptavidine forme des complexes ARNm-oligo(dT)-SMPs. Un aimant mobile permet d'isoler ces complexes et les ARNm qui leurs sont complexés. Les ARNm sont ensuite élués.

### **6.2- Transcription inverse**

La transcription inverse (RT) est réalisée immédiatement après extraction (Reverse Transcription Core Kit, Eurogentec, Seraing, Belgique). Cette étape correspond à la synthèse d'un ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARNm précédemment extraits.

Conformément aux recommandations du fournisseur, 4 µL d'ARNm (soit 0,6 mg de tissu) sont mis en présence d'un mix (volume final 10 µL) contenant 1 µL de tampon 10X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µL de mix contenant les nucléotides (2,5 mM), 0,5 µL d'oligo(dT) (50 µM), 0,2 µL d'un inhibiteur de RNase (20U/µL) et 0,25 µL d'enzyme (Euroscript Reverse Transcriptase ; 50 U/µL). Les tubes contenant le mélange réactionnel sont incubés à 25°C pendant 10 minutes afin de dénaturer les structures secondaires de l'ARN. Puis l'incubation se poursuit pendant 30 minutes à 48°C, température optimale d'activité de l'enzyme. A l'issue de cette étape, l'enzyme est dénaturée à 95°C pendant 5 minutes. Les échantillons d'ADN complémentaire (ADNc) sont ensuite placés dans la glace pendant 5 minutes puis stockés à -20°C jusqu'à la réalisation des PCR.

### **6.3- PCR quantitative en temps réel**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) ou polymérisation par extension d'amorces est une technique d'amplification de l'ADN mise au point par Mullis en 1986 (Mullis et al. 1986)). En 1992, la possibilité de suivre l'amplification de l'ADN cycle par cycle (PCR en temps réel) a permis à cette technique de devenir la méthode de référence de quantification des acides nucléiques (Higuchi et al. 1992). Dans notre protocole, la fluorescence est émise par un intercalant (SybrGreen) qui n'est fluorescent que lorsqu'il est lié à l'ADN double brin.

La PCR quantitative, développée ultérieurement, a pour but de quantifier un échantillon d'ADNc amplifié à l'aide d'amorces spécifiques. Le produit de la PCR est détecté en mesurant en continu (d'où le terme de « temps réel ») la fluorescence causée par la liaison du SybrGreen à l'ADN double brin. Cet intercalant permet donc de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque étape d'extension de la PCR. La dénaturation a pour effet de libérer les molécules de SybrGreen en solution, entraînant une diminution de la fluorescence.

#### **6.3.1 - Dessin des amorces**

Le dessin des amorces est effectué à l'aide du logiciel MacVector Software (Accelrys, San Diego, USA). Ces amorces sont synthétisées par le laboratoire Eurogentec (Seraing, Belgique). Les séquences des amorces sens et anti-sens utilisées lors de nos expérimentations sont récapitulées en **annexes 1 et 2**.

La spécificité de l'amplification de la PCR est vérifiée par l'analyse de la courbe de fusion (comme décrit par Peinnequin et al. 2004). Les pics de fusion issus du produit de RT et de l'ADN recombinant spécifique doivent être identiques.

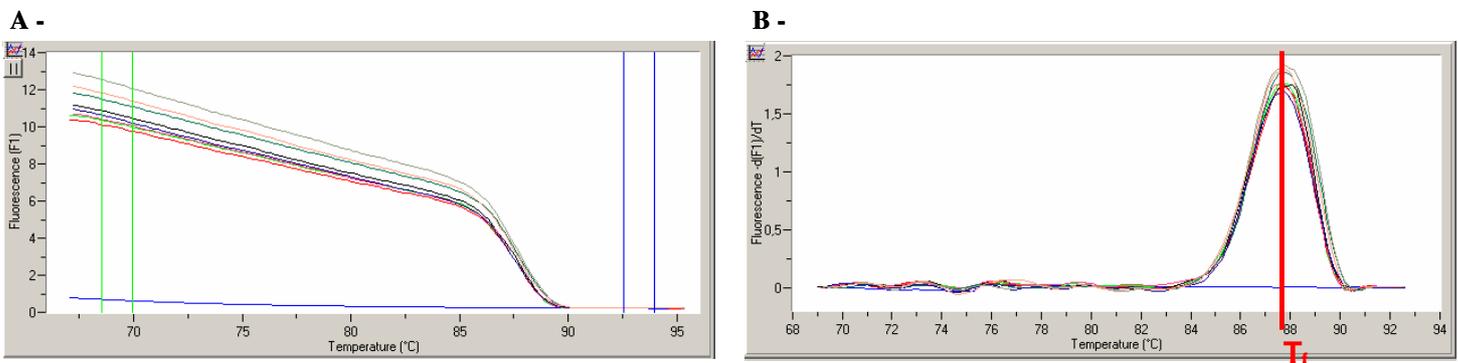
### 6.3.2 - Réaction de polymérisation en chaîne

La PCR quantitative en temps réel est réalisée dans un thermocycleur « Light Cycler à capillaires » (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne) avec le réactif Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Le volume final de 20  $\mu\text{L}$  contient 0,25  $\mu\text{L}$  de solution d'ADNc (soit 15  $\mu\text{g}$  de tissu), du  $\text{MgCl}_2$  à une concentration de 4 ou 5 mM et chaque amorce à une concentration optimisée de 0,4 ou 0,5  $\mu\text{M}$  (**annexes 1 et 2**).

Après une phase d'activation de la polymérase de 10 minutes à 95°C, 50 cycles d'amplification sont réalisés. Chaque cycle d'amplification comprend trois étapes :

- la dénaturation correspondant à la séparation des deux brins d'ADN (20 s à 95°C) ;
- l'hybridation correspondant à la fixation des amorces sur leur séquence complémentaire d'ADNc (température dépendante de la taille et de la composition en bases de l'amorce : 52 à 62 °C pendant 5 s) ;
- enfin l'élongation correspondant à la synthèse des brins d'ADNc (8 s à 72°C).

Après amplification, l'ADN amplifié est caractérisé par une courbe de fusion qui permet de déterminer la température de fusion ( $T_m$ ) de ce produit. Le  $T_m$  correspond à la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN présentes dans une solution sont dénaturées. Dans un environnement chimique donné, le  $T_m$  est une caractéristique de la molécule d'ADN (**figure 22**).

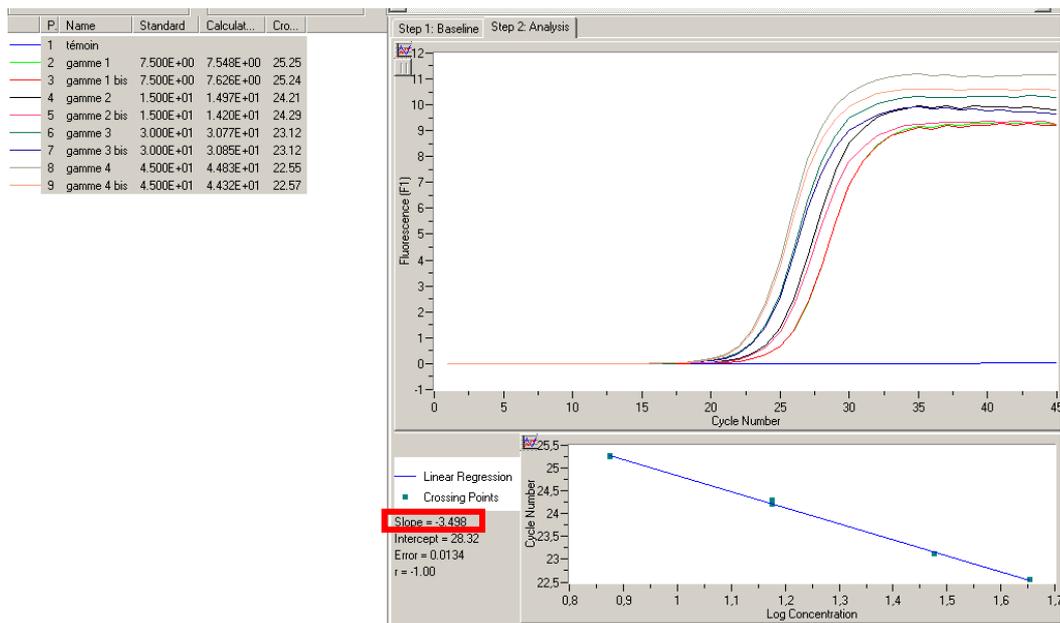


**Figure 22** : A- courbe de fusion : mesure de la fluorescence en continu en fonction de la température, pendant une phase de chauffage lente (de la « température d'hybridation + 10°C » jusqu'à 95°C à raison de 0,1°C/s) ; B- pic de fusion : la courbe représente l'opposée de la fonction dérivée de la fluorescence mesurée pendant la fusion en fonction de la température. Elle permet d'identifier la température de fusion ( $T_m$ ) (Logiciel Light Cycler Software v.3.5, Roche Applied Science Mannheim, Allemagne). Le tracé de couleur bleue, rectiligne, correspond au contrôle négatif contenant le mélange des réactifs de la PCR sans l'ADNc.

### 6.3.3 - Analyse des résultats

La synthèse d'ADN réalisée à chaque cycle est estimée par la mesure de la fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation. Cette mesure permet de tracer la courbe de fluorescence en fonction du

nombre de cycles d'amplification (**figure 23**). Cette courbe est composée de trois parties : une phase initiale exponentielle, une phase intermédiaire pendant laquelle le rendement de la réaction diminue et une phase finale « plateau » qui traduit l'arrêt de l'amplification. La mesure de la fluorescence pendant la phase exponentielle permet de déterminer le cycle de sortie ( $C_p$  ou  $C_t$  en fonction de la méthode de détermination utilisée). Cette valeur correspond au cycle d'amplification auquel la fluorescence due à l'ADN synthétisé est significativement supérieure au bruit de fond. Le  $C_t$  est d'autant plus précoce que la quantité d'ADNc cible présent initialement dans la réaction est importante. Il est utilisé pour calculer la quantité d'ADNc initiale sur la base d'un modèle exponentiel de l'amplification.



**Figure 23** : courbe de fluorescence en fonction du nombre de cycles d'amplification.

La spécificité de l'amplification est vérifiée par une étude de la courbe de fusion pour chaque échantillon, avant la phase d'analyse quantitative. Pour chaque échantillon, le  $C_t$  est déterminé par la méthode dite du « maximum de la dérivée seconde » ( $C_p$  sdm ; logiciel LightCycler Software v.3.5, Roche Applied Science, Mannheim, Allemagne). Cette méthode, indépendante du manipulateur, permet d'augmenter le *ratio* signal sur bruit en mesurant le  $C_t$  à la fin de la phase exponentielle en utilisant la méthode de la dérivée seconde.

La quantification relative de l'ADNc présent dans chaque échantillon est réalisée par rapport au pool de la totalité des échantillons de chaque structure (calibrateur) par la méthode dite de « comparaison des cycles de sorties » (comparative threshold cycle method, Livak & Schmittgen 2001). Cette méthode, basée sur un modèle mathématique exponentiel, utilise les différences de  $C_p$  entre chaque échantillon et le calibrateur pour le gène cible et les gènes de référence. Elle suppose une

efficacité théorique de PCR de 100%. Nous avons donc utilisé une méthode alternative qui prend en compte l'efficacité réelle de la PCR (Pfaffl 2001). L'efficacité de la PCR est mesurée pour chaque échantillon en utilisant le logiciel LinReg (Ramakers et al. 2003). La moyenne des efficacités mesurées dans les échantillons est utilisée dans les calculs comme décrit récemment (Cikos et al. 2007).

Pour tenir compte des différences de rendement des étapes pré-analytiques (extraction d'ARN, reverse transcription ...) entre les échantillons, les résultats sont normalisés par rapport à des contrôles internes appelés « gènes de référence ». Cette normalisation est effectuée par la moyenne géométrique d'au moins trois gènes de référence validés sur nos échantillons (Vandesompele et al. 2002). Cette méthode permet de déterminer à l'aide du logiciel Genorm<sup>®</sup> d'une part les gènes de référence les plus stables et d'autre part le nombre de gènes de référence à utiliser. En raison du modèle mathématique choisi, ce nombre ne peut être inférieur à trois. Dans notre étude la normalisation obtenue par la moyenne géométrique de CycA (cyclophilin A), ARBP (acidic ribosomal phosphoprotein) et HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) est validée par le logiciel. Son coefficient de stabilité (0,12) est inférieure au seuil de 0,15, valeur à partir de laquelle l'ajout d'un gène de normalisation supplémentaire est nécessaire (Vandesompele et al. 2002).

### **7) Dosages sanguins et cérébraux**

#### **7.1- Détermination de la concentration plasmatique en corticostérone**

La détermination quantitative de la corticostérone plasmatique (recueillie sur héparine) est effectuée par radio-immuno-assay (RIA) en utilisant le kit « Coat-A-Count Rat corticosterone » (Diagnostics Products Corporation, USA). Le principe consiste à doser la corticostérone par liaison compétitive à des anticorps spécifiques anti-corticostérone. La technique de RIA est basée sur une compétition entre la corticostérone marquée (fournie par le kit) et celle non marquée de l'échantillon pour se fixer sur des anticorps fixés (coatés) au fond des tubes de dosage fournis par le kit.

Après décongélation à température ambiante, les échantillons de plasma sont centrifugés pendant 15 minutes à 4000 g afin d'éliminer les débris cellulaires. Une quantité connue de corticostérone marquée à l'iode 125 (<sup>125</sup>I) est ajoutée à 50 µL de l'échantillon plasmatique. Le mélange est mis en présence d'une quantité connue d'anticorps spécifique anti-corticostérone fixés au fond des tubes de dosage. La corticostérone marquée et celle non marquée vont alors se fixer aux anticorps. Après centrifugation et élimination du surnageant par aspiration, la radioactivité présente dans le culot (qui contient les complexes corticostérone-anticorps et corticostérone marquée-anticorps) est déterminée à l'aide d'un compteur gamma. Plus la corticostéronémie est élevée, plus il existe de complexes corticostérone-anticorps et moins il existe de complexes avec la corticostérone marquée à l'iode donc moins la radioactivité est élevée. La quantification est réalisée grâce à une courbe de calibration

réalisée avec un étalon de corticostérone non marquée fourni par le kit. Les essais sont réalisés en triplicate.

Ce kit possède une très bonne sensibilité puisqu'il permet la détection d'une concentration minimale de 5,7 ng/mL et présente des coefficients de variation (CV) faibles et uniformes (CV intra-essai : 4% ; CV inter-essai : 5%). Par ailleurs, la spécificité théorique de ce test est de 100% pour la corticostérone de Rat.

### **7.2- Détermination de la concentration plasmatique en aldostérone**

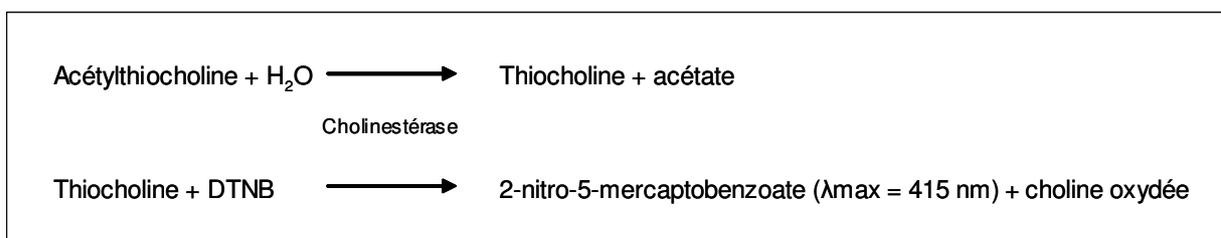
La détermination quantitative de l'aldostérone plasmatique (recueillie sur héparine) est effectuée par RIA en utilisant le kit DSL-8600 ACTIVE® (Diagnostic System Laboratories, USA). Le principe du dosage et de la quantification sont les mêmes que pour le dosage de la corticostérone plasmatique.

Les essais sont réalisés en triplicate avec une prise d'essai de 100 µL. Ce kit permet la détection d'une concentration minimale de 7,64 ng/mL. Les coefficients intra et inter-essai sont respectivement de 4% et 10%. Par ailleurs, ce test est hautement spécifique puisque la spécificité théorique est de 100% pour l'aldostérone de Rat.

Du fait d'un manque de plasma, la détermination de la concentration plasmatique en aldostérone n'a pu être réalisée qu'au délai J12.

### **7.3- Détermination de l'activité cholinestérasique sanguine**

La mesure de l'activité enzymatique ChE repose sur la méthode d'Ellman (Ellman et al. 1961), méthode indirecte, modifiée pour être standardisée sur l'automate de biochimie HITACHI 712. C'est une méthode de mesure cinétique de l'activité qui mesure les variations d'absorbance d'un chromogène, le TNB (acide 5-mercapto-2-nitrobenzoïque). Le substrat de l'enzyme dont on veut mesurer l'activité est constitué par l'acétylthiocholine (ACTCh) (**figure 24**). Les produits formés sont la thiocholine et l'acétate. Le groupement thiol de la thiocholine réduit le DTNB (acide dithio-5,5'-bis-(nitro-2 benzoïque)) en TNB, composé jaune mesuré à 415 nm. Les conditions opératoires sont déterminées de manière à mesurer la vitesse initiale, et la pente de la droite permet de calculer l'activité enzymatique.



**Figure 24** : schéma de la réaction d'Ellman

Le substrat est l'ACtCh à la concentration finale de  $1 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Le chromogène, le DTNB est à la concentration finale de  $0,25 \text{ mmol.L}^{-1}$ . La réaction est réalisée dans le tampon phosphate  $52 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,2. Pour un volume réactionnel total de  $542 \mu\text{L}$ , le volume de prise d'essai est de  $12 \mu\text{L}$  de sang total dilué au 1/10 (dans la saponine).

La réduction du DTNB en TNB est déterminée par mesure de l'absorbance à  $415 \text{ nm}$  après 4 min de réaction. A ce délai, la coloration est encore directement proportionnelle à l'activité cholinestérasique. Celle-ci est exprimée en U/L ( $\mu\text{mol ACtCh hydrolysées/min/L}$ ).

Dans le but de maintenir la PB liée à l'enzyme jusqu'au dosage, les échantillons sont maintenus à  $4^\circ\text{C}$  après décongélation. La quantification est réalisée grâce à une vérification quotidienne par le standard « calibrator cfas » (Roche, France). Après passage de ce standard, ayant mesuré la vitesse de la réaction enzymatique et connaissant l'activité cible, l'appareillage peut calculer un facteur de proportionnalité appelé K facteur (Kf). Celui-ci permet de convertir les vitesses initiales mesurées pour chaque échantillon en activité enzymatique.

La limite de détection de ce test est de  $20 \text{ U/L}$  et les précisions intra et inter-essai sont, respectivement, de  $0,9\%$  et  $0,8\%$ .

L'activité AChE est déterminée de la même façon, après inhibition de l'activité BuChE par un inhibiteur spécifique, l'iso-OMPA (tétraisopropyl pyrophosphoramidate ; Sigma, France) dont la concentration dans le milieu réactionnel final est de  $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ . L'inhibiteur est incubé en présence de l'échantillon pendant 3 heures à  $4^\circ\text{C}$ .

### **7.4- Détermination de l'activité cholinestérasique cérébrale**

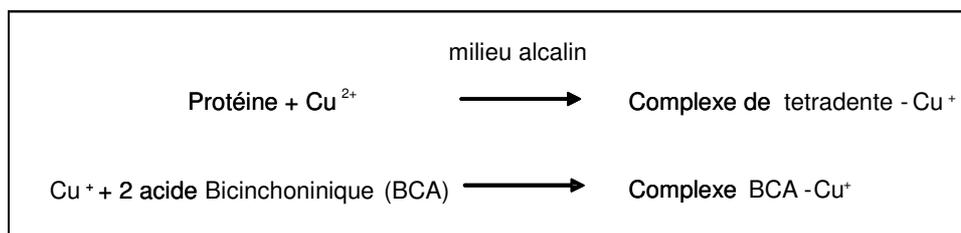
Les dosages sont effectués sur les parties droites des prélèvements conservées à  $-80^\circ\text{C}$  jusqu'au moment du dosage. L'activité ChE et les taux de protéines sont déterminés sur les structures cérébrales après broyage et extraction de celles-ci, réalisés selon le protocole suivant :

- homogénéisation des structures cérébrales au potter de Thomas ( $1300 \text{ tr/min}$ ), refroidi par de la glace fondante, dans  $700 \mu\text{L}$  d'une solution de saccharose  $0,32 \text{ mol.L}^{-1}$  / TRIS/HCl  $50 \text{ mmol.L}^{-1}$  pH 7,4 ;
- centrifugation de l'homogénat 15 min à  $1000 \text{ g}$  à  $8^\circ\text{C}$  ;
- le surnageant est prélevé et conservé sur de la glace pilée jusqu'à l'analyse qui intervient dans la demi-heure : mesure de l'activité ChE et dosage des protéines.

Deux aliquots de  $120 \mu\text{L}$  de surnageant sont ensuite ajoutés à  $40 \mu\text{L}$  de TRIS saccharose contenant ou non de l'iso-OMPA. L'activité ChE est ensuite déterminée, en présence ou non de l'inhibiteur comme décrit précédemment sur l'automate de biochimie Hitachi 712. La prise d'essai d'échantillon est de  $6 \mu\text{L}$ , le volume de DTNB ( $0,26 \text{ mM}$ ) est de  $330 \mu\text{L}$  et celui de l'ACtCh ( $17,8 \text{ mM}$ ) est de  $20 \mu\text{L}$ .

Tous les résultats sont rapportés à la teneur en protéines mesurée sur les surnageants des broyats cérébraux par la méthode B.C.A. (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA) standardisée sur l'automate de biochimie Hitachi 712. Les résultats sont exprimés en mU/mg de protéines.

La méthode B.C.A. est une technique dite « Biuret » améliorée. L'échantillon à doser est mis en présence d'une solution alcaline d'acide bicinchoninique (BCA) et de  $\text{CuSO}_4$  de coloration verte. Les ions  $\text{Cu}^+$  formés créent avec le BCA un complexe coloré en pourpre dont l'absorbance est mesurée à 562 nm (**figure 25**). L'absorbance ou densité optique mesurée présente une proportionnalité à la concentration en protéines de l'échantillon. Une gamme étalon de protéines réalisée avec de l'albumine sérique bovine (BSA) permet la quantification.



**Figure 25** : principe de la technique BCA de dosage des protéines

## **8) Techniques d'immunomarquages et de coloration sur coupes cérébrales**

L'observation de coupes de tissus ou d'organes se fait à l'échelle cellulaire et subcellulaire par l'intermédiaire de la microscopie optique. Les coupes examinées sont le fruit de procédures techniques qui requièrent plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, coupes, marquage (ou coloration), montage puis observation.

### **8.1- Fixation, inclusion en paraffine et coupes**

Les cerveaux ont été fixés *in vivo* puis post-fixés comme décrit précédemment.

Les tissus nerveux étant épais, il faut réaliser des coupes fines et régulières. Or pour cela le tissu doit être préalablement inclus. L'inclusion permet la conservation de l'échantillon et a pour objectif d'imprégner totalement les cellules d'une substance durcissante qui permettra la réalisation des coupes. La substance la plus utilisée pour l'inclusion en vue d'une observation en microscopie optique est la paraffine. La paraffine étant hydrophobe, le prélèvement doit tout d'abord subir une déshydratation par immersion dans des bains d'alcool de degrés croissants puis dans des bains de toluène. Après déshydratation, l'imprégnation du tissu s'effectue dans un moule contenant une paraffine maintenue à l'état liquide (le point de fusion de la paraffine est d'environ 58°C), qui infiltre alors tout le tissu. Après refroidissement, l'organe se trouve inclus à l'intérieur du bloc de paraffine.

Des coupes sériées de 5 micromètres d'épaisseur (ou 10 µm pour les immunomarquages des jonctions serrées) de chaque cerveau ont été réalisées à l'aide d'un microtome et après récupération en milieu liquide (bain-marie à 40°C) étalées sur des lames silanisées, traitées électrostatiquement (Starfrost, Milian, France), puis séchées à l'étuve à 56°C pendant 12 heures.

Lors de cette étude, nous avons sélectionné 2 zones d'intérêt par cerveau (18 lames à 5 µm et 6 lames à 10 µm par plan) à raison de 2 coupes par lame. Les coupes ont donc été réalisées au niveau de différents plans, identifiés à l'aide de l'Atlas « The Rat Brain in stereotaxic coordinates » 2<sup>ème</sup> édition Paxinos et Watson (Academic Press 1986) :

- le striatum postérieur (bregma -0,8 à -1,4) (**annexe 3**) permet d'observer la zone subventriculaire impliquée dans la neurogenèse. L'observation de cette structure est particulièrement intéressante pour visualiser l'apoptose ainsi que la prolifération cellulaire pouvant être induite par les différents traitements administrés aux animaux.
- l'hippocampe antérieur (bregma -2,56 à -3,6) (**annexe 4**) permet l'observation de marquage au niveau du CA1, CA3 et de la zone subgranulaire du gyrus dente. L'hippocampe est une structure particulièrement impliquée dans les processus d'apprentissage. Les immunomarquages réalisés au niveau de cette structure nous permettront de visualiser les éventuels effets du stress et de la PB sur les performances de nos animaux dans le labyrinthe aquatique.

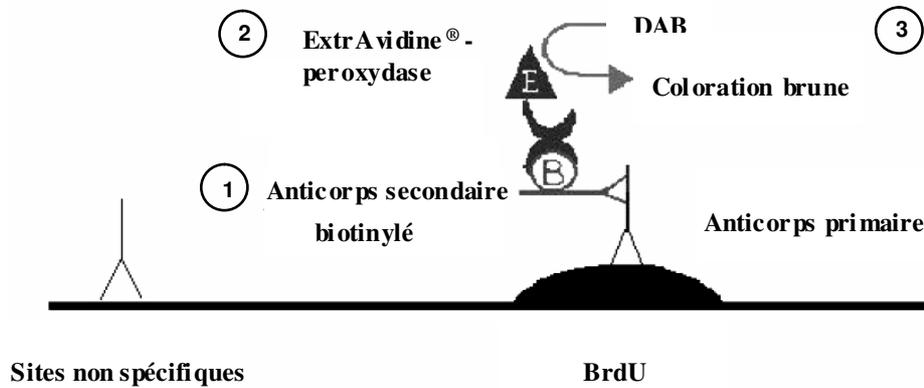
### **8.2- Etude sur coupes histologiques**

Lors de cette étude, différents immunomarquages ont été réalisés :

- AChE : la PB étant un anticholinestérasique, nous avons choisi de réaliser des immunomarquages anti-AChE afin de mettre en évidence une éventuelle différence de marquage chez les animaux traités par cette molécule ;
- IgG et albumine : certaines études mettant en évidence des effets de la PB au niveau du SNC, nous avons choisi d'utiliser des anticorps dirigés contre l'IgG et l'albumine afin de visualiser une éventuelle rupture de la BHE facilitant le passage de molécules circulantes au niveau du SNC. Par ailleurs, l'albumine possède un poids moléculaire inférieur à celui de l'IgG. Nous voulions ainsi tenter de déterminer la taille de l'éventuelle rupture de BHE ;
- Claudine 5 : protéine des jonctions serrées permettant de vérifier l'intégrité de la BHE ;
- BrdU dans le but d'étudier la prolifération cellulaire induite par le stress, le traitement par la PB ou leur association ;

L'immunohistologie correspond à l'immunomarquage des tissus biologiques utilisant des anticorps spécifiques et une enzyme comme révélateur. Dans les protocoles que nous avons mis en œuvre, il s'agit

d'immunomarquage indirect puisqu'un premier anticorps va se fixer à l'antigène. Puis un second anticorps couplé à la biotine et dirigé contre le premier anticorps permet la révélation après amplification par liaison de la biotine à l'extrAvidine® (Sigma, France), elle-même couplée à une peroxydase (**figure 26**).



**Figure 26** : principe de l'immunomarquage de type indirect extravidine® biotine peroxydase. Après fixation de l'anticorps primaire sur l'antigène, 1/ l'anticorps secondaire portant une molécule de biotine se fixe à l'anticorps primaire, 2/ la biotine fixe un complexe extravidine peroxydase, 3/ la DAB oxydée forme un précipité brun.

Les marquages à la peroxydase présentent certains inconvénients :

- la peroxydase peut être inactivée par l'oxygène, l'acide hypochlorique et l'azide de sodium. Il est donc conseillé d'utiliser une eau très pure.
- la présence de peroxydase endogène dans certains tissus (macrophages, globules rouges) peut augmenter le bruit de fond. Pour cette raison, dans nos protocoles nous avons une étape d'inhibition des peroxydases endogènes.

L'immunomarquage comprend cinq étapes importantes, après déparaffinage et éventuel démasquage :

- l'inactivation des peroxydases endogènes ;
- la saturation des sites non spécifiques ;
- l'immunomarquage par lui-même grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques et la révélation ;
- la contre-coloration ;
- le montage entre lame et lamelle.

*NB : dans le but d'obtenir le meilleur marquage compatible avec une détérioration minimale des tissus, les procédures immunohistologiques ont été établies après des essais préliminaires. Nous avons fait varier plusieurs paramètres (quantité de tampon à utiliser, épaisseur des coupes, dilution optimale de chaque anticorps) en marquant des coupes de cerveau de rats destinés aux mises au point. La technique décrite ici est celle grâce à laquelle nous avons obtenu le meilleur marquage.*

### 8.2.1 - Etapes précédant la technique immunohistologique

Le déparaffinage permet d'éliminer la paraffine présente autour des coupes. Celles-ci sont ensuite réhydratées afin de pouvoir travailler en milieu aqueux (dans du tampon TBS). Brièvement, les lames sont déparaffinées dans trois bains successifs de toluène (3 fois 5 minutes) puis réhydratées dans des bains d'éthanol de degrés décroissants (5 minutes chaque bain) : 2 bains d'alcool 100°, un bain d'alcool 95°, un bain d'alcool 80°, un bain d'alcool 70° puis un bain d'eau distillée.

Le « démasquage antigénique » est nécessaire pour l'immunomarquage anti-BrdU. Ainsi, afin de faciliter l'accès de l'anticorps à la BrdU, nous avons utilisé une technique de « démasquage » classique à l'HCl.

Les sections tissulaires destinées au marquage par les anticorps dirigés contre les antigènes BrdU sont incubées à 65°C durant 30 minutes dans l'HCl 1N. Après une incubation de 5 minutes dans l'acide borique à température ambiante, les lames sont placées dans du TBS 1X.

Cerclage des coupes au stylo DakoPen (Dako SA, Trappes, France).

### 8.2.2 - Réaction immunohistologique

Inhibition des peroxydases endogènes : les coupes sont incubées pendant 10 minutes dans du tampon TBS contenant 0,3% de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) afin d'inactiver les peroxydases endogènes responsables du bruit de fond. Ce mélange est préparé extemporanément.

Equilibration de l'osmolarité dans du Tampon Tris Salin (TBS) dilué au 1/10<sup>ème</sup>, appelé TBS 1X.

Saturation des sites de fixation non spécifique des anticorps : selon l'origine de l'anticorps secondaire, les coupes sont incubées pendant 30 minutes dans du sérum normal de chèvre (GIBCO, France) ou d'âne (Béthyl, Interchim, France) dilués au 1/10<sup>ème</sup> dans du TBS 1X.

L'immunomarquage est ensuite réalisé par incubation des coupes en présence d'un anticorps primaire spécifique de l'antigène étudié. Une amplification du marquage est réalisée par utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la biotine qui se fixe à l'anticorps primaire. La révélation est obtenue par utilisation du système biotine/streptavidine-peroxydase.

- Anticorps primaire : les anticorps primaires sont appliqués aux dilutions indiquées dans le tableau joint (**annexe 5**), pendant une nuit à 4°C, en chambre humide. La dilution des anticorps se fait dans du TBS 1X contenant 2% de sérum de chèvre (ou d'âne pour l'albumine). Il faut compter environ 150 µL d'anticorps dilué par coupe. Trois rinçages de 15 minutes dans du TBS 1X sont ensuite effectués à l'issue de l'incubation.
- Anticorps secondaire : ce sont des anticorps biotinylés de chèvre anti-souris ou anti-lapin (Sigma, France) ou d'âne anti-mouton (dilués au 1/50<sup>ème</sup> dans du TBS 1X contenant 2% de sérum de chèvre ou d'âne). Après dilution, l'anticorps est appliqué pendant 45 minutes à 37°C. Puis on rince trois fois 5 minutes dans du TBS 1X.
- Application du complexe streptavidine-peroxydase (Sigma, France) dilué au 1/50<sup>ème</sup> dans du TBS 1X pendant 45 minutes. Les coupes sont ensuite rincées trois fois 5 minutes dans du TBS 1X.

- Révélation de l'activité peroxydase par application du chromogène 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB) pendant 3 à 5 minutes (Sigma, France). Puis on rince à l'eau courante. Ce chromogène est oxydé par la peroxydase et donne un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques.

Contre-coloration avec l'hématoxyline de Harris (Merck, France), pendant 5 secondes. Les noyaux cellulaires bleuissent à l'eau courante pendant 5 minutes. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore en bleu les structures acides (ADN, ARN) du noyau et du réticulum endoplasmique rugueux (RER). La contre-coloration des noyaux facilite le comptage des cellules.

Montage avec lamelles dans un baume synthétique (Eukitt<sup>®</sup>, Dutscher, France) après déshydratation dans des bains d'éthanol croissant.

### 8.2.3 - Les contrôles

Divers types de contrôle ont été réalisés :

Des contrôles positifs d'une ouverture de la BHE ont été réalisés en utilisant des coupes de cerveaux de rats prélevés 48 heures après injection unique (200 mg/kg, i.p., 1mL/kg) de (S)-(+)-3-chloro-1, 2-propanediol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) (Willis et al. 2004).

Des contrôles négatifs ont été réalisés pour chaque antigène détecté, sans l'anticorps primaire.

### 8.2.4 - Coloration histologique classique

Les colorations réalisées sur coupes accentuent les contrastes et permettent ainsi de mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. Comme les colorants sont en solution aqueuse, les coupes doivent d'abord subir une réhydratation.

Lors de cette étude, une coloration Hémalum-Phloxine (H&P) est réalisée (Lillie & Fullmer 1976). L'hémalum est un colorant basique qui colore en bleu les structures acides (ADN, ARN) du noyau et du réticulum endoplasmique rugueux. La phloxine est un colorant acide qui colore les structures basiques (protéines cytoplasmiques) en rose. Le cytoplasme apparaîtra donc en rose.

Comme pour les immunomarquages, les lames sont préalablement déparaffinées dans du toluène (3 bains d'une minute) puis réhydratées dans des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante avant d'être rincées pendant 5 minutes à l'eau courante. Elles sont ensuite plongées pendant 15 secondes dans une solution d'hémalum, rincées puis placées dans de la phloxine (3%) pendant 2 minutes 30. Après plusieurs rinçages dans des bains d'eau courante, les coupes cérébrales sont déshydratées par des bains successifs d'éthanol de concentration croissante, placées dans deux bains de toluène (3 minutes) puis montées entre lame et lamelle grâce à l'utilisation d'un baume synthétique (Eukitt<sup>®</sup>, Dutscher, France).

### 8.2.5 - La technique TUNEL

Au cours de la mort cellulaire par apoptose, des endonucléases induites provoquent une fragmentation de l'ADN et génèrent des extrémités 3'OH libres.

Le terme TUNEL vient de TdT (Terminal déoxynucleotidyl transferase) mediated dUTP-biotin Nick End Labelling. Cette méthode consiste à ajouter, aux extrémités 3'OH libres, un nucléotide marqué à la biotine mis en évidence suite à une réaction avec la streptavidine peroxydase.

Après déparaffinage et réhydratation des lames, une incubation de 15 minutes à température ambiante en présence de protéinase K à 20 µg/mL est effectuée pour perméabiliser les membranes nucléaires, rendant ainsi l'ADN accessible à l'enzyme. Puis les peroxydases endogènes sont inactivées par l'ajout d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> couplé au méthanol déposé sur chaque lame pendant 5 minutes à température ambiante. Un mélange de nucléotides biotinylés et de l'enzyme TdT est incubé à 37°C pendant 1H30 à l'obscurité et en chambre humide.

La réaction est ensuite arrêtée par incubation dans du tampon stop (fourni par le kit Apoptag, Calbiochem).

Les nucléotides biotinylés sont détectés en utilisant un conjugué streptavidine peroxydase. Celui-ci est placé sur les coupes pendant 30 minutes à température ambiante.

Enfin, la DAB réagit avec la peroxydase en générant un produit brun permettant de visualiser les cellules dites « TUNEL positives ». Une contre-coloration à l'hématoxyline est ensuite réalisée, puis les lames sont déshydratées et montées entre lame et lamelle.

## **9) Analyses statistiques**

La majorité des résultats est présentée sous la forme moyenne  $\pm$  SEM (Standard Error Mean) de n individus ; n étant indiqué pour chaque groupe.

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées au moyen du logiciel Statistica® Software version 7.1 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) par analyse Anova-Manova, suivie d'une analyse post-hoc en utilisant le test de Newman-Keuls.

Au niveau des résultats, \* représente une significativité au seuil de 5% ; \*\* correspond à une significativité au seuil de 1% et \*\*\* représente un effet significatif avec une probabilité d'erreur inférieure à 0,1%.

Le groupe « contrôle » est défini comme le lot sham-eau.



# **METHODOLOGIE**

**- PROTOCOLES EXPERIMENTAUX -**



## Protocoles expérimentaux

Lors de ce travail, trois expérimentations ont été réalisées. Pour chacune d'elles, nous présenterons succinctement les objectifs poursuivis et le déroulement de l'étude.

### 1) Expérimentation I : pré-expérimentation

#### 1.1- Objectifs de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le but de (i) vérifier que les modifications apportées au test original de PCA induisent bien un stress et (ii) vérifier l'efficacité du traitement par la pyridostigmine administrée par voie orale à la posologie de 1,5 mg/kg.

La validité du modèle de stress est évaluée par le suivi du poids des animaux et la détermination des stéroïdes circulants (corticostérone, aldostérone). La posologie et la voie d'administration choisies pour le traitement par la PB sont validées en terme d'inhibition des activités ChE et AChE périphériques.

#### 1.2- Déroulement de l'étude

Lors de cette expérimentation, 32 rats Wistar mâles adultes sont répartis, dès leur arrivée, en 4 lots de 8 animaux : sham-eau, sham-PB, PCA-eau, PCA-PB.

De J1 à J5 et de J8 à J12, ils reçoivent la PB (ou l'eau) par voie orale à la posologie de 1,5 mg/kg puis sont soumis au test PCA 30 minutes après le traitement.

Des prélèvements sanguins en intracardiaque sont réalisés sous anesthésie à l'halothane à J0 et J8, avant toute expérimentation et à J5 juste après la séance quotidienne de PCA. A J12, immédiatement après la dernière séance de PCA, les animaux sont décapités et le sang est prélevé.

Les prélèvements sanguins sont destinés à une étude cinétique des taux de corticostérone et d'activités ChE et AChE sanguines. Par ailleurs, les prélèvements sanguins obtenus à J12 ont permis la mesure des taux plasmatiques d'aldostérone.

En parallèle, différentes structures cérébrales sont prélevées à J12 (striatum, hippocampe et cortex frontal) afin de vérifier une éventuelle inhibition des activités ChE et AChE cérébrales induite par 10 jours de traitement par la PB.

### 2) Expérimentation II : conséquences comportementales, histologiques et moléculaires semi-retardées

#### 2.1- Objectifs de l'étude

Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer, *ex vivo*, les éventuelles conséquences comportementales, cellulaires et moléculaires semi-retardées de l'association du stress et du traitement par la PB.

## **2.2- Déroulement de l'étude**

Lors de cette expérimentation, 32 rats Wistar mâles adultes sont répartis, dès leur arrivée, en 4 lots de 8 animaux comme précédemment décrit.

De J1 à J5 et de J8 à J12, les animaux reçoivent la PB (ou l'eau) par voie orale à la posologie de 1,5 mg/kg puis sont soumis au test PCA 30 minutes après le traitement.

### **2.2.1 - Test comportemental**

Le test du labyrinthe aquatique est réalisé de J15 à J19. Il est systématiquement précédé d'une séance de rappel du contexte stressant en plaçant les rats pendant deux minutes dans la cage de « pole-climbing test » sans déclenchement des chocs électriques.

Le nombre d'erreurs et le temps de parcours sont enregistrés.

### **2.2.2 - Prélèvements**

Les prélèvements cérébraux sont effectués à J22, soit 3 jours après la fin du test du labyrinthe aquatique et 10 jours après la fin du stress et du traitement.

Pour chaque lot de 8 animaux, 3 rats sont destinés au prélèvement du cerveau fixé dans le but de déterminer les conséquences histopathologiques du traitement. Comme spécifié précédemment, ces animaux reçoivent, au préalable, durant le dernier jour du labyrinthe aquatique, deux injections *i.p.* de BrdU.

Sur les 5 animaux restants, différentes structures cérébrales sont prélevées : hypothalamus, hippocampe, cortex frontal et striatum. Les structures gauches et l'hypothalamus sont destinés à l'évaluation des conséquences moléculaires du traitement grâce à la réalisation de PCR. Les structures droites sont prélevées dans le but de déterminer les activités ChE et AChE cérébrales.

### **2.2.3 - Evaluation de l'expression génique**

Lors de cette expérience, nous nous sommes intéressés à l'expression de différents gènes :

- cFos et cJun, deux gènes dont l'expression permet d'évaluer l'activation cellulaire ;
- AChE : la PB inhibant de façon réversible l'activité AChE, nous avons choisi d'évaluer l'expression du gène de cette enzyme ;
- GFAP et S100 $\beta$  afin de mettre en évidence une éventuelle activation gliale ainsi que la qualité neuronale des différentes structures cérébrales.

Chaque couple d'amorces utilisées a été mis au point par la réalisation de gammes de dilution à partir d'un pool total de nos échantillons pour chaque structure. La mise au point des PCR a été validée lorsque la pente avoisinait -3,32 correspondant à une efficacité théorique de PCR de 100%. Les échantillons ont alors été passés individuellement dans les conditions de PCR précédemment validées.

### **3) Expérimentation III : conséquences moléculaires précoces**

#### **3.1- Objectif de l'étude**

Le but de cette expérimentation est d'évaluer les conséquences moléculaires observées immédiatement après 10 jours de stress et de traitement par la PB.

#### **3.2- Déroulement de l'étude**

Lors de cette expérimentation, 32 rats Wistar mâles adultes sont répartis, dès leur arrivée, en 4 lots de 8 animaux comme précédemment décrit.

De J1 à J5 et de J8 à J12, les animaux reçoivent la PB (ou l'eau) par voie orale à la posologie de 1,5 mg/kg puis sont soumis au test PCA 30 minutes après le traitement.

##### **3.2.1 - Prélèvements**

A J12, soit juste après la dernière séance de stress et de traitement par la PB, l'hypothalamus, l'hippocampe, le cortex frontal et le striatum sont disséqués et placés dans du RNAlater. Ces prélèvements sont destinés aux analyses d'expression génique par biologie moléculaire.

##### **3.2.2 - Evaluation de l'expression génique**

L'activité transcriptionnelle de différents gènes a été évaluée par PCR. Cette expérimentation a été conduite en deux temps :

- dans un premier temps, nous avons évalué l'expression d'un grand nombre de gènes afin de cibler ceux dont les variations d'expression semblaient importantes. Les PCR ont alors été réalisées sur 4 pools correspondant à nos 4 lots d'animaux et ce pour chaque structure cérébrale choisie (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex frontal). Nous avons choisi d'étudier l'expression des ARNm de différents gènes impliqués dans la régulation de l'axe HPA, et dont la transcription est affectée par le stress (Hsp70, I- $\kappa$ B, Il-1 $\alpha$ , GR, MR, MCIP1 et CRF). Par ailleurs, lors du test du labyrinthe aquatique (expérimentation II), nous avons évalué les capacités d'apprentissage de nos animaux ; nous avons donc estimé, dans cette expérimentation III, l'expression de différents gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (CamKII $\alpha$ , BDNF et TrkB).

- dans un second temps, et au vu des résultats sur les pools, nous avons évalué individuellement dans l'hypothalamus et dans l'hippocampe, l'expression des gènes suivants : Hsp70, I- $\kappa$ B, Il-1 $\alpha$ , MR, GR, CamKII $\alpha$ , BDNF et TrkB. Par ailleurs comme pour l'expérimentation II, nous avons choisi d'étudier, individuellement, c-Fos, c-Jun et AChE.

L'activation de la transcription de NF- $\kappa$ B est déterminée par l'analyse de l'expression des ARNm de son inhibiteur I- $\kappa$ B, comme suggéré par l'équipe de Bottero (Bottero et al. 2003)



**- RESULTATS -**



L'objectif de ce travail est d'évaluer les effets d'un stress répété, tel que peut le subir tout combattant en opérations, associé au pré-traitement par la pyridostigmine, sur le fonctionnement cérébral et les fonctions cognitives. En effet, des expérimentations antérieures réalisées au laboratoire font soupçonner l'instauration de séquelles tardives chez le Rat suite à un stress répété associé à la prise chronique de PB.

Les expérimentations présentées dans ce manuscrit visent à évaluer, *ex vivo*, les conséquences cellulaires et moléculaires précoces et semi-retardées de l'association PB et stress répété. Différentes expérimentations ont été menées : (i) la première visant à valider le modèle de stress utilisé ainsi que la posologie et la voie d'administration de la PB ; (ii) la seconde permettant d'étudier les effets des différents traitements administrés au niveau comportemental ainsi que les conséquences histologiques et moléculaires semi-retardées de ces traitements ; (iii) enfin, nous avons évalué les effets du stress et de la PB sur la transcription de plusieurs gènes dans différentes structures cérébrales au délai J12, immédiatement après le stress.

Durant ces différentes études, un suivi des animaux a été réalisé. Il apparaît qu'au cours de la phase de « quarantaine », c'est-à-dire pendant les deux semaines qui ont suivi la réception des animaux, et avant l'expérimentation, les rats n'ont manifesté aucun trouble particulier lors de leur séjour à l'animalerie. Après administration, *per os*, de PB (1,5 mg/kg), aucune modification du comportement spontané n'a été constatée.

#### **1) Résultats du test du Pole Climbing Avoidance (PCA)**

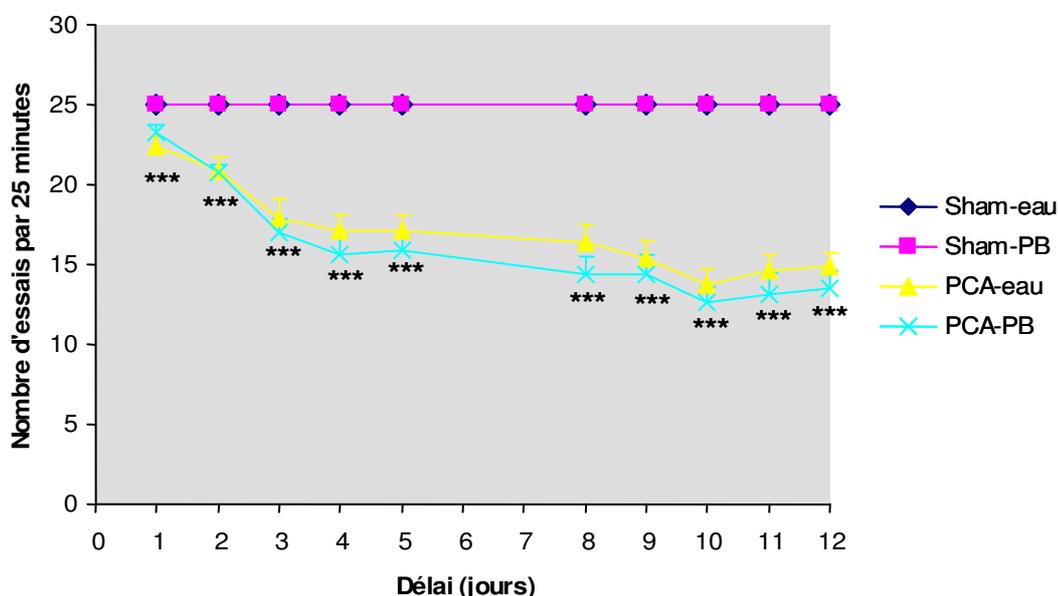
A l'origine, le Pole Climbing Avoidance (PCA) a été développé en tant que test d'apprentissage utilisant un stimulus auditif (Le Poncin-Lafitte et al. 1982). Pour les besoins de nos études, ce test a été modifié afin d'appliquer un stress répété aux animaux avec la particularité qu'ils puissent y échapper. Des études préliminaires réalisées au laboratoire ont permis de valider les paramètres permettant d'induire ce type de stress. Ainsi, chaque session quotidienne de PCA dure 25 minutes (au lieu de 10 dans le test classique) et ce test est appliqué pendant 10 jours (au lieu de 5).

Les résultats obtenus pour l'ensemble des trois expérimentations (96 animaux) sont présentés dans la **figure 27**.

L'application du PCA modifié induit une « impulsivité » accrue des animaux, que traduit la diminution du nombre d'essais par séance. Le rat, cherchant à anticiper à tout prix le choc électrique, ne tient plus compte du stimulus sonore pour s'accrocher au mât.

L'analyse statistique globale par ANOVA mesures répétées des résultats du PCA révèle un effet du stress ( $F(10, 74) = 39,865$  ;  $p \leq 0,001$ ), aucun effet de la PB ( $F(10, 74) = 0,59$  ;  $p = 0,82$ ) et aucune interaction entre le stress et la PB ( $F(10, 74) = 0,59$  ;  $p = 0,82$ ).

L'analyse post-hoc (test Newman-Keuls, NK) montre que le stress se traduit par une diminution significative du nombre d'essais mesurés, dès le premier jour d'application du PCA et lors de chaque session quotidienne (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ , PCA vs sham ; test NK).



**Figure 27 :** Représentation du nombre d'essais mesurés quotidiennement pour chaque groupe expérimental lors du test du Pole Climbing. Les valeurs sont exprimées en moyenne du nombre d'essais  $\pm$  SEM (n = 24 par lot). Dès J1, les animaux soumis au test PCA présentent un nombre d'essais inférieur aux animaux des lots « sham » (\*\*\*,  $p < 0,001$  ; PCA vs sham ; test NK).

## **2) Pré-expérimentation : validation du modèle de stress et du choix de la posologie et de la voie d'administration de la pyridostigmine**

Nous rappelons que le but de cette étude est de valider notre modèle expérimental en termes de stress et de traitement par la PB.

### **2.1- Validation du choix du PCA en tant que modèle de stress**

Lors de cette pré-expérimentation, du sang est prélevé à J0 et J8, avant toute manipulation, et à J5 et J12, immédiatement après la séance de PCA.

#### **2.1.1 - Evolution de la concentration plasmatique en corticostérone**

La cinétique d'évolution des taux plasmatiques de corticostérone mesurés immédiatement avant (J0 et J8) et après les séances de PCA (à J5 et J12) est présentée dans le **tableau 7**. Les valeurs sont présentées en ng/mL.

	J0	J5	J8	J12
<b>Sham-eau</b>	77 ± 16	182 ± 37	109 ± 24	190 ± 54
<b>Sham-PB</b>	94 ± 16	196 ± 26	252 ± 43	180 ± 50
<b>PCA-eau</b>	126 ± 30	565 ± 34 ***	172 ± 78	627 ± 93 ***
<b>PCA-PB</b>	240 ± 60	593 ± 54 ***	241 ± 49	710 ± 44 ***

**Tableau 7 :** évolution des taux plasmatiques de corticostérone chez les animaux des 4 lots avant application (J0 et J8) et juste après application (J5 et J12) du PCA. Les valeurs sont exprimées en ng/mL et représentent la moyenne de chaque groupe ± SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives entre les différents groupes et le lot contrôle « sham-eau » du jour considéré sont présentées (\*\*\*, p < 0,001 ; test NK).

L'analyse statistique par ANOVA répétée à deux facteurs révèle un effet global du stress (F(4, 23) = 27,104 ; p < 0,001), aucun effet de la PB (F(4, 23) = 1,92 ; p = 0,14) et aucune interaction entre le stress et la PB (F(4, 23) = 0,69 ; p = 0,60).

L'analyse statistique a ensuite été réalisée, délai par délai, par le test de Newman-Keuls.

A J0, les animaux des groupes « PCA » présentent, avant toute expérimentation, des taux plus élevés de corticostérone que les animaux des lots « sham ». Toutefois, le test de Newman-Keuls (NK) montre que les quatre lots ne sont pas significativement différents. Il est à noter que les taux plus élevés de corticostérone observés chez les lots PCA sont dus à la présence de quatre animaux (deux par lot) présentant des valeurs particulièrement élevées (> 200 ng/mL de corticostérone plasmatique).

A J5, le test NK montre que l'application du test PCA se traduit par une augmentation significative des taux de corticostérone d'un facteur 3 que les animaux soient traités ou non par la PB (p < 0,001, comparaison au lot sham-eau ; test NK). Le traitement par la PB ne modifie pas l'effet induit par le test PCA.

A J8, c'est-à-dire deux jours après interruption du test PCA et du traitement, la corticostéronémie mesurée, avant réalisation du test, chez les deux lots d'animaux « PCA » sont équivalentes à celles observées à J0.

A J12, comme à J5, l'application du PCA se traduit par une hypercorticostéronémie puisqu'on assiste à une augmentation d'un facteur 3 des taux plasmatiques mesurés chez les animaux soumis au PCA (p < 0,001, comparaison au lot sham-eau ; test NK).

### 2.1.2 - Evolution de la concentration plasmatique en aldostérone

L'effet du test PCA modifié sur les concentrations plasmatiques d'aldostérone est présenté dans le **tableau 8**. Il est important de spécifier que lors de cette expérimentation, les 32 animaux n'ont été soumis à aucune anesthésie ni à aucun prélèvement intermédiaire. Nous avons donc déterminé les taux

plasmatiques d'aldostérone à J12, immédiatement après la dernière séance de PCA. Ces valeurs sont exprimées en pg/mL.

	Concentration en aldostérone
<b>Sham-eau</b>	447 ± 61
<b>Sham-PB</b>	477 ± 43
<b>PCA-eau</b>	1499 ± 221 ***
<b>PCA-PB</b>	1239 ± 132 *

**Tableau 8 :** taux plasmatiques d'aldostérone chez les animaux des 4 lots juste après la dernière application du PCA, soit à J12. Les valeurs sont exprimées en pg/mL et représentent la moyenne de chaque groupe ± SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*, p < 0,05, \*\*\*, p < 0,001 ; comparaison au lot sham-eau ; test NK).

L'analyse statistique ANOVA suivie du test de Newman-Keuls révèle que chez les animaux recevant ou non la PB, l'application du PCA se traduit par une augmentation des concentrations plasmatiques d'aldostérone (p < 0,001, PCA-eau vs sham-eau ; p < 0,05, PCA-PB vs sham-eau ; test NK). De plus, l'analyse statistique révèle que la PB diminue l'effet induit par le PCA sur les concentrations plasmatiques d'aldostérone (p < 0,05, PCA-PB vs PCA-eau ; test NK).

#### 2.1.3 - Evolution du poids des animaux

Au cours des 10 jours de test PCA, les animaux traités ou non par la PB n'ont manifesté aucun trouble particulier lors de leur séjour à l'animalerie. Il est cependant à noter que les animaux des lots « stress » ont fréquemment présenté des selles molles pendant les 25 minutes de chaque séance quotidienne de PCA.

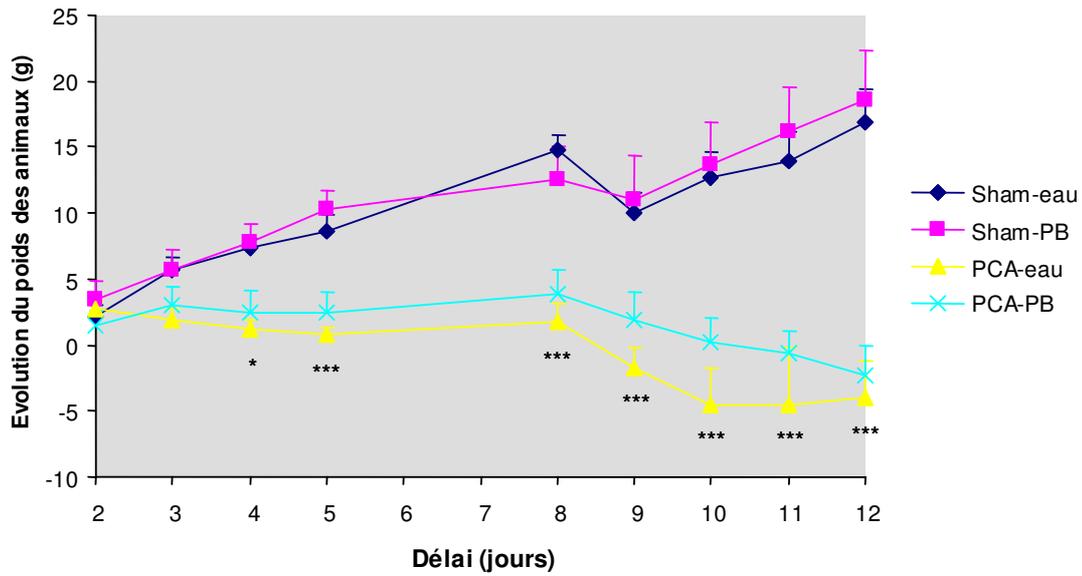
##### Poids des animaux

Les animaux des 4 groupes présentent un poids équivalent au début de l'expérimentation (337 ± 3 g). En 12 jours, le poids des animaux « sham-eau » a évolué de 337 ± 5,6 g à 354 ± 7,3 g. En ce qui concerne les animaux non-stressés traités par la PB, leur poids a évolué de 329 ± 7 g à 347 ± 9,3 g. Enfin, le poids des animaux « PCA-eau » et « PCA-PB » initialement de 343 ± 5,9 g et de 339 ± 5,3 g, respectivement, a diminué pour atteindre 339 ± 7,8 g et 336 ± 5,8 g, respectivement, à J12.

Après 10 jours de test PCA, le poids des animaux soumis au PCA diffère de celui des animaux « sham » (351 ± 5,6 g vs 338 ± 4,8 g, respectivement) (p < 0,05, PCA vs sham ; test NK).

Gain de poids des animaux

Le gain de poids quotidien des animaux est représenté par la **figure 28**. A la fin des 10 jours de test PCA et de traitement, les animaux des groupes « sham-eau » et « sham-PB » présentent un gain de poids de  $17 \pm 2,5$  g et  $19 \pm 3,8$  g, respectivement. A l'inverse, les rats des lots « PCA-eau » et « PCA-PB » montrent une perte de poids de  $4 \pm 2,8$  g chez les animaux non traités et de  $2 \pm 2,2$  g chez les animaux recevant de la PB.



**Figure 28** : représentation du gain de poids des animaux mesuré avant chaque séance quotidienne de test du Pole Climbing. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*,  $p < 0,05$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ; PCA vs sham ; test NK). Le gain de poids est évalué par rapport à J1.

L'analyse statistique ANOVA mesures répétées à deux facteurs révèle un effet du PCA ( $F(9, 19) = 7,33$  ;  $p < 0,001$ ), aucun effet de la PB ( $F(9, 19) = 1,14$  ;  $p = 0,38$ ) et aucune interaction entre le test PCA et la PB ( $F(9, 19) = 1,69$  ;  $p = 0,16$ ).

L'analyse statistique a ensuite été réalisée, délai par délai, par le test NK et révèle que, dès J4, les animaux soumis au test PCA présentent un plus faible gain de poids, voire une perte de poids, par rapport aux rats des lots « sham » ( $p < 0,05$ , PCA vs sham). Cet effet se poursuit jusqu'au dernier jour de l'expérimentation ( $p < 0,001$ , PCA vs sham). Le traitement par la PB ne modifie pas l'effet du test du pole climbing.

*En résumé, les animaux soumis au test PCA présentent une hypercorticostéronémie et une augmentation des taux plasmatiques d'aldostérone. L'application du test PCA modifié active donc l'axe HPA traduisant une réaction de stress. Les animaux des lots « PCA » montrent par ailleurs une perte de poids lorsqu'ils sont comparés aux animaux « sham » placés dans la même enceinte que les*

lots « PCA » mais sans application de choc électrique. Nous pouvons donc en conclure que les modifications apportées à la version originale du PCA induisent, chez le rat Wistar mâle adulte, un stress se traduisant par des modifications des constantes biologiques. Ainsi les animaux soumis au test PCA modifié seront désormais dénommés dans la suite de ce manuscrit, lots « stress-eau » ou « stress-PB ».

De plus, nous avons constaté des troubles gastro-intestinaux chez les animaux soumis au test PCA. Enfin des travaux préliminaires menés au laboratoire ont mis en évidence que les animaux replacés dans les mêmes conditions expérimentales, six mois après la fin du stress mais sans application de choc électrique, s'accrochent immédiatement au mât. On note donc une persistance de la réaction de l'animal pendant plusieurs mois.

## **2.2- Validation de la voie d'administration et de la posologie du traitement par la pyridostigmine**

### **2.2.1 - Cinétique de l'activité cholinestérasique (ChE) sanguine**

Les effets d'un traitement oral par la PB (1,5 mg/kg par jour) sur l'activité cholinestérasique (ChE) sanguine sont présentés dans le **tableau 9**. Les valeurs sont données en unités par litre (U/L).

	<b>J0</b>	<b>J5</b>	<b>J8</b>	<b>J12</b>
<b>Sham-eau</b>	1843 ± 77	1789 ± 52	2095 ± 57	1905 ± 149
<b>Sham-PB</b>	1898 ± 55	1219 ± 40 ***	2161 ± 38	1026 ± 51 ***
<b>Stress-eau</b>	1920 ± 46	1782 ± 56	2184 ± 127	1880 ± 80
<b>Stress-PB</b>	1968 ± 97	999 ± 95 ***	2172 ± 50	1078 ± 50 ***

**Tableau 9** : évolution de l'activité ChE sanguine des animaux des différents groupes, déterminée à J0 et J8 immédiatement avant le traitement par la PB, et 5 et 12 jours après le PCA. Les valeurs sont exprimées en U/L et représentent la moyenne ± SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives entre les lots traités et non traités par la PB par rapport au contrôle « sham-eau » sont présentées (\*\*\*, p < 0,001, PB vs eau ; test NK).

L'analyse statistique ANOVA mesures répétées à deux facteurs révèle un effet du traitement par la PB ( $F(4,22) = 57,98$  ;  $p < 0,001$ ) mais ne montre aucun effet du stress ( $F(4, 22) = 0,88$  ;  $p = 0,49$ ) ni aucune interaction entre le stress et la PB ( $F(4, 22) = 0,68$  ;  $p = 0,61$ ).

L'analyse statistique a ensuite été réalisée, délai par délai, par le test NK et révèle qu'à J0, avant toute expérimentation, les animaux des quatre lots ne sont pas statistiquement différents. A aucun délai, on ne note d'effet du stress sur l'activité ChE du sang.

A J5, l'administration de PB se traduit par une diminution de l'activité ChE sanguine chez les animaux « sham-PB » (-37%,  $p < 0,001$ , sham-PB vs sham-eau ; test NK). Cette inhibition se retrouve à J12 (-44%,  $p < 0,001$ , sham-PB vs sham-eau ; test NK).

L'inhibition de l'activité ChE sanguine est également observée lorsque le stress est associé au pré-traitement à J5 et à J12 ( $p < 0,001$ , stress-PB vs sham-eau ; test NK).

A J8, c'est-à-dire après deux jours d'interruption du stress et du traitement, l'effet inhibiteur de la PB n'est plus observé. En effet, pour chacun des lots, les valeurs obtenues ne diffèrent pas de celles observées à J0.

### 2.2.2 - Cinétique de l'activité AChE sanguine

Lors du dosage, l'utilisation d'iso-OMPA, inhibiteur spécifique de la BuChE, permet de mesurer l'activité acétylcholinestérasique (AChE) seule. Les effets d'un traitement oral par la PB (1,5 mg/kg par jour) sur l'activité AChE sanguine sont présentés dans le **tableau 10**. Les valeurs sont données en unités par litre (U/L).

	J0	J5	J8	J12
<b>Sham-eau</b>	1252 ± 51	1481 ± 66	1472 ± 71	1607 ± 147
<b>Sham-PB</b>	1302 ± 86	854 ± 30 ***	1548 ± 52	1160 ± 88
<b>Stress-eau</b>	1503 ± 53	1483 ± 97	1643 ± 122	1822 ± 209
<b>Stress-PB</b>	1393 ± 75	889 ± 56 ***	1693 ± 94	1208 ± 122 ***

**Tableau 10** : évolution de l'activité AChE sanguine des animaux des différents groupes, déterminée à J0 et J8, immédiatement avant le traitement par la PB, et 5 et 12 jours après la séance de PCA, soit 1 heure après traitement par l'eau ou la PB. Les valeurs sont exprimées en U/L et représentent la moyenne ± SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives entre les lots traités et non traités par la PB par rapport au contrôle « sham-eau » sont présentées (\*\*\*,  $p < 0,001$  ; PB vs eau ; test NK).

L'analyse statistique ANOVA mesures répétées à deux facteurs révèle un effet du traitement par la PB ( $F(4,25) = 7,47$  ;  $p < 0,001$ ), aucun effet du stress ( $F(4, 25) = 1,94$  ;  $p = 0,13$ ) et aucune interaction entre le stress et la PB ( $F(4, 25) = 0,25$  ;  $p = 0,91$ ).

L'analyse statistique, délai par délai, par le test NK révèle les faits suivants :

- A J0, les animaux des quatre lots présentent une activité AChE sanguine similaire et ne sont donc pas différenciables.

- Pour chacun des délais, on ne note pas d'effet significatif du stress sur l'activité AChE.

- A J5, l'effet du traitement par la PB est observé chez les animaux « sham » (-42%,  $p < 0,001$ , sham-PB *vs* sham-eau ; test NK) comme chez les lots « stress » (-40%,  $p < 0,001$ , stress-PB *vs* sham-eau ; test NK).

- A J8, c'est-à-dire après deux jours d'interruption du PCA et du traitement, l'effet inhibiteur de la PB a disparu. Pour chacun des lots, les activités ne diffèrent pas significativement des valeurs observées à J0.

- A J12, on note une diminution non significative de 28% de l'activité AChE chez les animaux non stressés ( $p = 0,29$ ). Par contre chez les animaux stressés, le traitement par la PB se traduit par une diminution significative de l'activité AChE (-31%,  $p < 0,001$ , stress-PB *vs* sham-eau ; test NK). Le lot stress-PB ne diffère pas significativement du lot stress-eau ( $p = 0,075$ ). Les valeurs à J12 ne diffèrent pas significativement des valeurs observées à J5 quel que soit le lot étudié.

*En résumé, le traitement par voie orale d'une dose de 1,5 mg/kg de PB se traduit par une inhibition des activités ChE et AChE sanguines de l'ordre de 30 à 40 %. Ce taux d'inhibition correspond aux recommandations de l'OTAN dans le cadre de l'utilisation de la PB en cas de menace chimique. La voie d'administration et la posologie que nous avons retenues, chez le Rat, miment le pré-traitement administré aux soldats.*

#### **2.3- Effets du stress et de la pyridostigmine sur les activités ChE et AChE cérébrales**

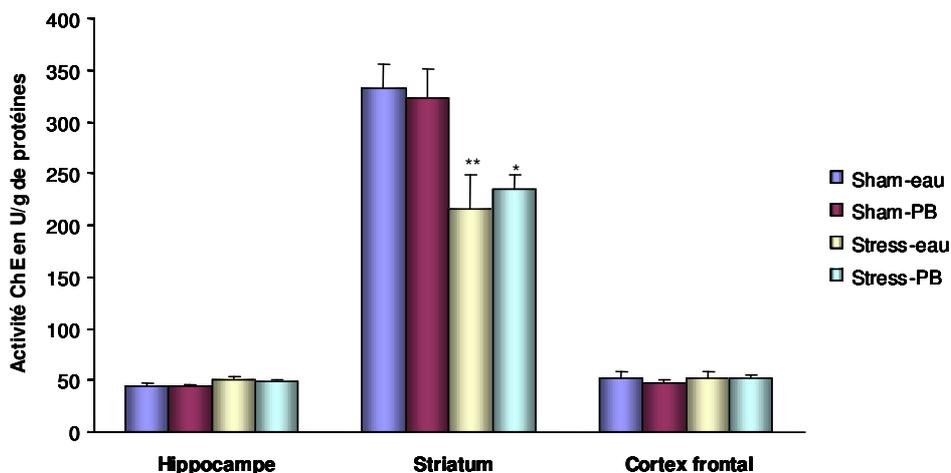
A J12, c'est-à-dire après la dernière séance de PCA quotidienne, les cerveaux des rats ont été prélevés pour la détermination des activités ChE et AChE au niveau de trois structures cérébrales : l'hippocampe, le striatum et le cortex frontal.

##### **2.3.1 - Activité cholinestérasique cérébrale**

Les mesures de l'activité ChE de trois structures cérébrales après 10 jours de stress et de traitement par la PB sont présentées dans la **figure 29**. L'activité ChE est exprimée en U/g de protéines.

Au niveau de l'hippocampe comme du cortex frontal, l'analyse statistique ANOVA suivie du test NK révèle que ni le stress, ni la PB ne modifient l'activité ChE.

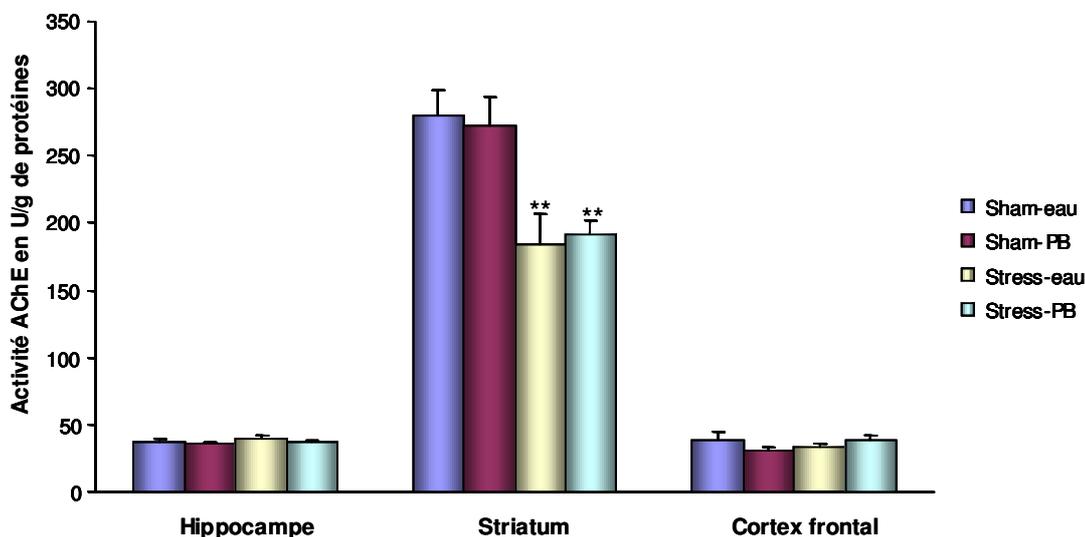
Au niveau du striatum, le stress induit une inhibition de cette activité aussi bien chez les animaux traités par la PB (-27%,  $p < 0,05$ , stress-PB *vs* sham-eau ; test NK) que chez les rats non traités (-35%,  $p < 0,01$ , stress-eau *vs* sham-eau ; test NK). Aucun effet significatif du traitement par la PB sur l'activité ChE striatale n'est observé.



**Figure 29** : activité cholinestérasique cérébrale au niveau de trois structures cérébrales prélevées immédiatement après la dernière séance de PCA. Les valeurs exprimées en U/g de protéines représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*, p < 0,05 ; \*\*, p < 0,01 ; comparaison au lot contrôle « sham-eau » ; test NK).

### 2.3.2 - Activité AChE cérébrale

L'utilisation d'iso-OMPA permet d'inhiber l'activité BuChE et ainsi de mesurer l'activité AChE cérébrale. Les mesures de cette activité dans trois structures cérébrales après 10 jours de stress et de traitement par la PB sont présentées dans la **figure 30**. L'activité AChE est exprimée en U/g de protéines.



**Figure 30** : Activité AChE cérébrale au niveau de trois structures cérébrales prélevées immédiatement après la dernière séance de PCA. Les valeurs, exprimées en U/g de protéines, représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*\*, p < 0,01 ; comparaison au lot contrôle « sham-eau » ; test NK).

L'analyse statistique ANOVA suivie du test NK révèle que ni l'application du PCA, ni le traitement par la PB ne modifient l'activité AChE au niveau de l'hippocampe comme du cortex frontal.

Au niveau du striatum, le stress induit une inhibition de l'activité AChE aussi bien chez les animaux traités par la PB (-32%,  $p < 0,01$ , stress-PB vs sham-eau ; test NK) que chez les rats non traités (-35%,  $p < 0,01$ , stress-eau vs sham-eau ; test NK). Aucun effet significatif du traitement par la PB sur l'activité AChE striatale n'est observé.

*En résumé, le traitement par la PB n'induit aucune modification des activités ChE comme AChE dans les trois structures cérébrales étudiées (hippocampe, striatum et cortex frontal) que les animaux aient été ou non stressés. Ces résultats suggèrent qu'à J12, 1 heure après traitement par la PB et immédiatement après la dernière séance de PCA, la PB n'a eu aucun effet sur l'activité ChE ni AChE au niveau du SNC. Deux hypothèses peuvent être avancées : soit la PB n'a pas franchi la BHE, soit elle l'a franchi mais en quantité insuffisante pour être détectable au niveau du SNC.*

*Par contre le test PCA modifié, c'est-à-dire le stress répété, induit une inhibition de ces activités au niveau du striatum que les animaux aient été ou non traités par la PB.*

### **3) Expérimentation II : effets semi-retardés (J22) du stress et du traitement par la pyridostigmine**

Nous rappelons que cette étude vise à évaluer les conséquences semi-retardées du stress et du traitement par la PB sur différents paramètres : (i) les processus d'apprentissage lors d'un test de labyrinthe aquatique réalisé de 3 à 7 jours après l'arrêt du stress ; (ii) les paramètres histopathologiques au niveau cérébral et (iii) l'expression génique au niveau de différentes structures cérébrales. Les prélèvements destinés à évaluer ces deux derniers paramètres ont été réalisés à J22 soit 10 jours après arrêt du stress et du traitement, et 3 jours après la fin du test de labyrinthe aquatique.

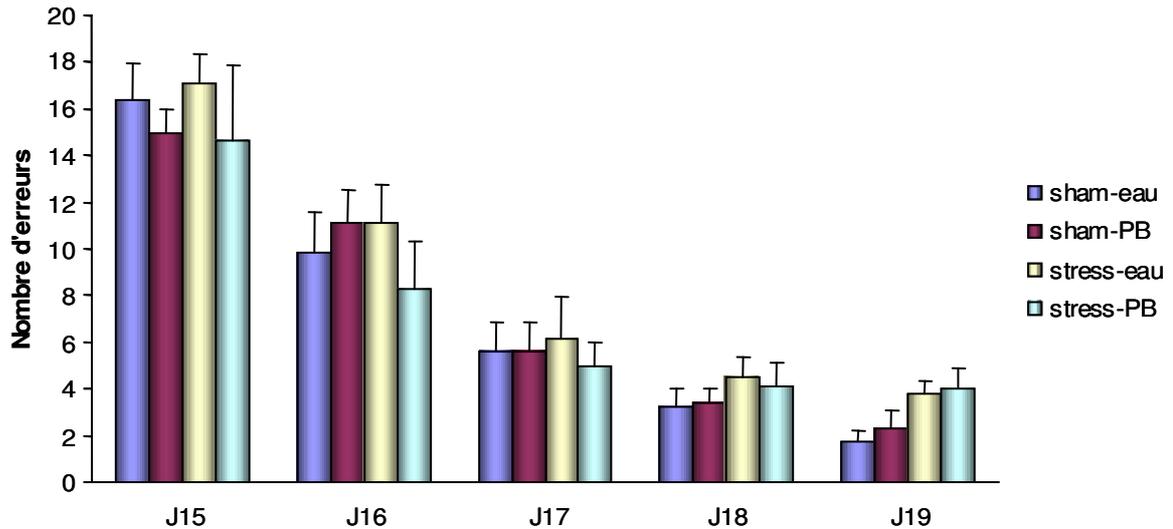
#### **3.1- Effets semi-retardés du stress et du traitement sur l'apprentissage des animaux**

L'apprentissage est évalué lors du test du labyrinthe aquatique. Pendant ce test, le nombre d'erreurs ainsi que le temps de parcours des animaux sont relevés. Nous rappelons qu'avant chaque session de labyrinthe aquatique, les animaux sont placés dans l'enceinte ayant servi pour le PCA, sans application du choc électrique, afin de leur rappeler les conditions stressantes.

Les conséquences comportementales de l'application du stress et du traitement par la PB sont présentées dans les **figures 31 et 32**.

##### **3.1.1 - Evolution du nombre d'erreurs des animaux dans le labyrinthe aquatique**

La **figure 31** présente le nombre d'erreurs enregistrées pour les 4 lots d'animaux lors de chaque séance quotidienne de labyrinthe aquatique.

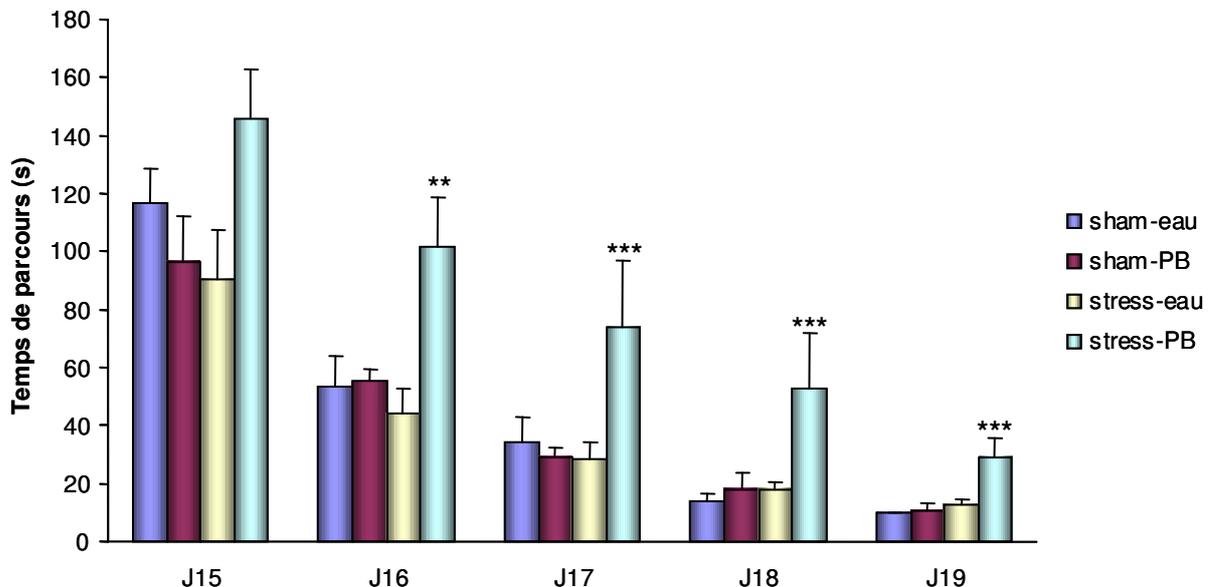


**Figure 31** : nombre d'erreurs enregistrées pour les 4 lots d'animaux lors de chaque séance quotidienne du test du labyrinthe aquatique réalisé de 3 à 7 jours après la dernière séance de test PCA. Le graphique représente la moyenne du nombre d'erreurs  $\pm$  SEM (n = 8 par lot) mesuré lors de chaque session quotidienne de labyrinthe.

L'analyse statistique par ANOVA mesures répétées ne montre aucun effet du stress ( $F(5, 24) = 1,45$  ;  $p = 0,24$ ), aucun effet du traitement par la PB ( $F(5, 24) = 0,45$  ;  $p = 0,81$ ) et aucune interaction entre ces deux facteurs ( $F(5, 24) = 0,3$  ;  $p = 0,91$ ).

### 3.1.2 - Evolution du temps de parcours des animaux dans le labyrinthe aquatique

La **figure 32** présente le temps de parcours observé pour les 4 lots d'animaux lors de chaque séance quotidienne de labyrinthe aquatique.



**Figure 32** : représentation des effets du stress et de la PB sur l'apprentissage des 4 lots d'animaux lors du test du labyrinthe aquatique réalisé de 3 à 7 jours après la dernière séance du test PCA. Les valeurs de temps de parcours dans le labyrinthe sont exprimées en secondes et représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ; comparaison au lot contrôle « sham-eau » ; test NK).

L'analyse statistique globale des résultats par ANOVA mesures répétées démontre, *a priori*, un effet du stress ( $F(5, 24) = 3,39$  ;  $p < 0,05$ ) et de la PB ( $F(5, 24) = 3,85$  ;  $p < 0,05$ ). Cependant l'analyse statistique révélant une interaction entre le stress et la PB ( $F(5, 24) = 4,84$  ;  $p < 0,01$ ), ces résultats doivent être interprétés avec prudence avant toute conclusion.

L'analyse délai par délai a ensuite été réalisée par le test NK. Quel que soit le délai, le stress n'induit pas d'effet sur le temps de parcours des animaux non traités. En effet, le temps de parcours des animaux du lot « stress-eau » ne diffère pas de celui observé chez les rats du lot contrôle « sham-eau ».

De même, le traitement par la PB ne modifie pas le temps de parcours des animaux non stressés.

Par contre, les animaux stressés recevant la PB présentent un temps de parcours plus élevé que les animaux des 3 autres groupes et ceci dès J16 ( $p < 0,01$ , stress-PB vs sham-eau ;  $p < 0,001$ , stress-PB vs stress-eau et stress-PB vs sham-PB ; test NK). Cet effet se poursuit jusqu'à J19 ( $p < 0,001$ , stress-PB vs sham-eau ; test NK).

*Au vu de ces résultats, l'association du stress et de la PB perturbe les capacités d'apprentissage des rats. Il est cependant à noter que les animaux du lot « stress-PB » continuent à apprendre puisque leur temps de parcours diminue tout au long du test d'apprentissage et qu'ils ne font pas plus d'erreurs. Nous pouvons donc plutôt suggérer un retard d'apprentissage chez ces animaux.*

#### **3.2- Effets semi-retardés du stress et du traitement par la pyridostigmine sur les activités cholinestérasiques cérébrales**

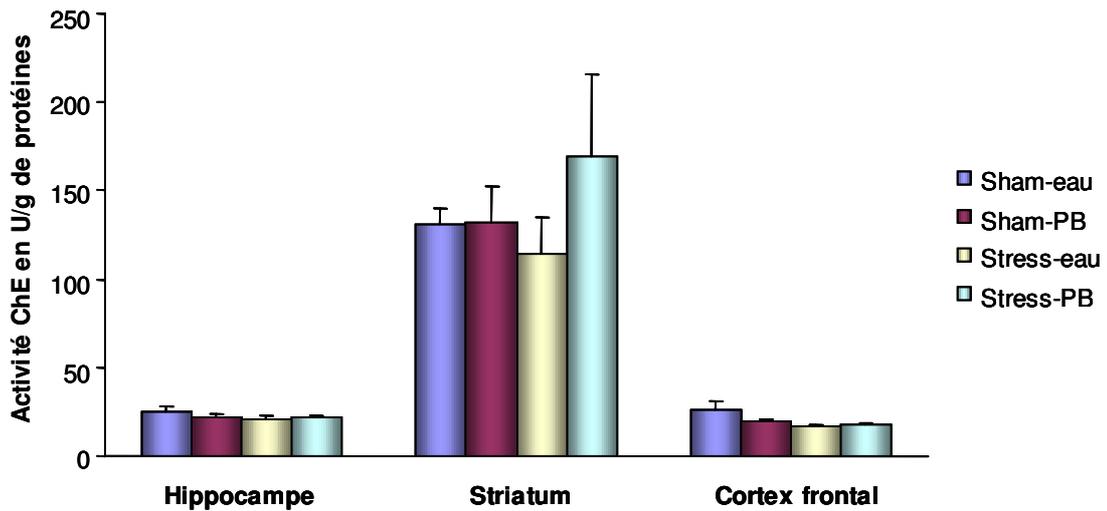
Comme décrit précédemment, l'application du PCA induit, immédiatement après la dernière séance de stress (à J12), une inhibition des activités ChE et AChE au niveau du striatum. Afin d'évaluer les conséquences plus tardives du PCA et du traitement par la PB, ces deux activités ont été mesurées à J22, soit 10 jours après arrêt du test et du traitement.

##### **3.2.1 - Détermination de l'activité ChE cérébrale à J22**

Les mesures de l'activité ChE des trois structures cérébrales 10 jours après arrêt du test PCA et du traitement sont présentées dans la **figure 33**.

Au niveau du striatum, comme de l'hippocampe, l'analyse statistique ANOVA suivie du test de Newman-Keuls ne révèle aucun effet significatif du stress, du traitement par la PB ou de leur association sur l'activité ChE.

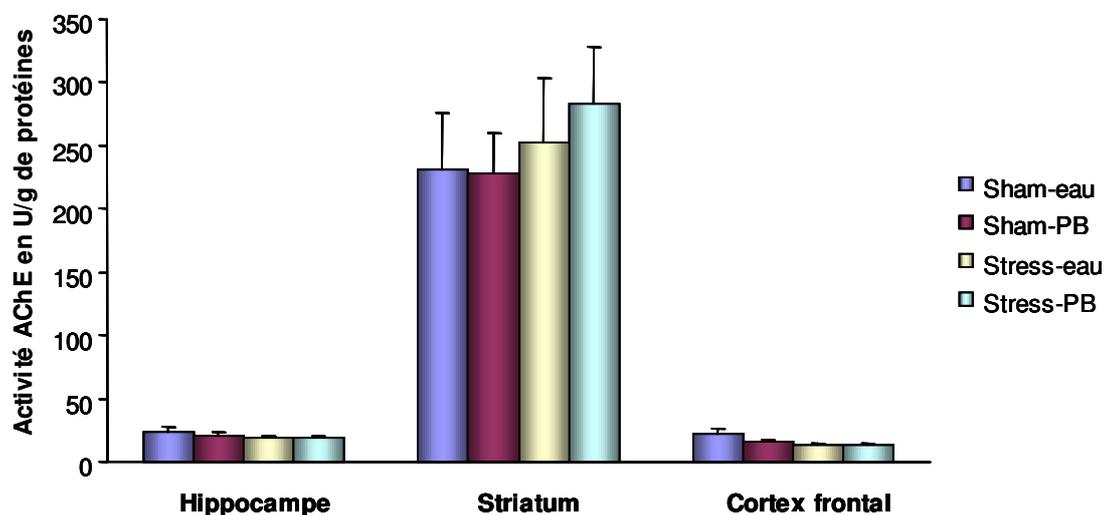
Au niveau du cortex frontal, le stress diminue l'activité ChE (-27%) ; cependant cet effet est à la limite de la significativité ( $p = 0,059$  ; stress vs sham ; test NK).



**Figure 33** : activité ChE, à J22, mesurée dans l'hippocampe, le striatum et le cortex frontal des animaux des 4 groupes. Les prélèvements ont été effectués 10 jours après arrêt du PCA et du traitement par la PB et 3 jours après la fin du test de labyrinthe aquatique. Les valeurs, exprimées en U/g de protéines, représentent la moyenne  $\pm$  SEM de chaque lot (n = 8 par lot).

### 3.2.2 - Détermination de l'activité AChE cérébrale à J22

L'activité AChE des trois structures cérébrales, après inhibition de la BuChE plasmatique par l'iso-OMPA, mesurée 10 jours après arrêt du test PCA et du traitement par la PB, est présentée dans la figure 34.



**Figure 34** : évolution de l'activité AChE des animaux des différents groupes dans l'hippocampe, le striatum et le cortex frontal. Les prélèvements ont été effectués 10 jours après arrêt du PCA et du traitement par la PB et 3 jours après la fin du test de labyrinthe aquatique. Les valeurs, exprimées en U/g de protéines, représentent la moyenne  $\pm$  SEM de chaque lot (n = 8 par lot).

Au niveau du striatum, comme de l'hippocampe, l'analyse statistique ANOVA suivie du test post-hoc de Newman-Keuls ne révèle aucun effet significatif du stress, du traitement par la PB ou de leur association sur l'activité AChE.

Au niveau du cortex frontal, le stress diminue l'activité AChE (-31%). Cependant l'analyse statistique révèle que cet effet est à la limite de la significativité ( $p = 0,057$  ; stress vs sham ; test NK).

*Au vu des résultats présentés ci-dessus, ni l'application du PCA ni le traitement par la PB ne modifient, de manière statistiquement significative, les activités ChE et AChE de l'hippocampe, du cortex frontal ni du striatum, 10 jours après la fin du stress et du traitement.*

*L'effet du stress observé à J12, au niveau du striatum, a disparu 10 jours après arrêt du stress et du traitement. Par contre, l'effet du stress sur ces activités est à la limite de la significativité au niveau du cortex frontal.*

### **3.3- Conséquences histologiques semi-retardées du stress et du traitement par la pyridostigmine**

#### 3.3.1- Validation des témoins

##### Témoins d'ouverture de barrière hémato-encéphalique

Afin de visualiser l'effet d'une ouverture de BHE, des témoins positifs ont été réalisés par traitement d'un animal avec du (S)-(+)-3-chloro-1, 2-propanediol (200 mg/kg, i.p., 1mL/kg), suivi d'une fixation 48 heures plus tard.

La **figure 35** illustre une coupe cérébrale de rat témoin positif après immunomarquage anti-albumine. Nous pouvons observer un important marquage anti-albumine au niveau des noyaux parvocellulaires oculomoteurs (oculomotor parvocellular nucleus) et des noyaux parvocellulaires rouges (red parvocellular nucleus) du thalamus. Ce marquage met en évidence la diffusion de l'albumine des capillaires dans le tissu cérébral consécutive à une altération de la BHE. Dans ce modèle, la rupture de BHE est observée au niveau de zones cérébrales spécifiques. Aucun marquage n'est observé, quelque soit la zone cérébrale étudiée, chez le rat « témoin négatif » n'ayant pas reçu la molécule (résultats non présentés).

##### Contrôle négatif d'immunomarquage

Par ailleurs, pour chaque type d'immunomarquage, nous nous sommes assurés de la spécificité du marquage en réalisant des contrôles négatifs en absence d'anticorps primaire. Pour ce faire l'incubation avec l'anticorps primaire est remplacée par une incubation d'une nuit à 4°C avec du

TBS 1X. L'observation de ces lames nous a permis de vérifier, pour chaque mise au point réalisée, l'absence de marquage non spécifique par l'anticorps secondaire (résultats non présentés).

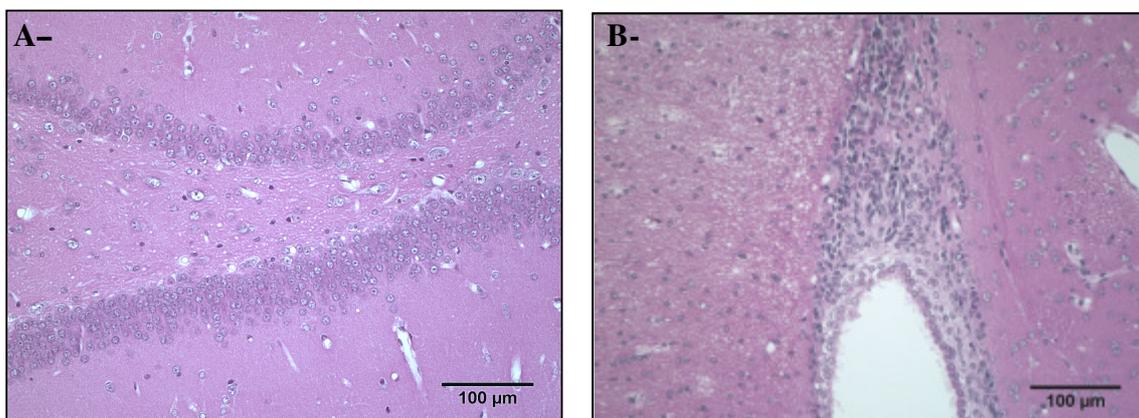


**Figure 35** : coupe cérébrale (5  $\mu$ m d'épaisseur) de rat témoin positif d'une ouverture de BHE suite à un traitement de l'animal avec du (S)-(+)-3-chloro-1, 2-propanediol (200 mg/kg, i.p., 1mL/kg).

### 3.3.2- Coloration hémalun-phloxine

L'hémalun est un colorant basique qui colore en bleu les structures acides (ADN, ARN) du noyau et du réticulum endoplasmique rugueux. La phloxine est un colorant acide qui colore les structures basiques (protéines cytoplasmiques) en rose. Le cytoplasme apparaîtra donc en rose. Cette coloration permet de visualiser, notamment, les atteintes cellulaires neurales par apparition d'une condensation des neurones en dégénérescence.

La **figure 36** illustre une coupe cérébrale de rat du lot stress-PB colorée par l'hémalun-phloxine. L'observation de l'ensemble des coupes de cerveau colorées à l'hémalun-phloxine ne révèle aucune altération cellulaire quel que soit le traitement et que les animaux aient été ou non stressés.

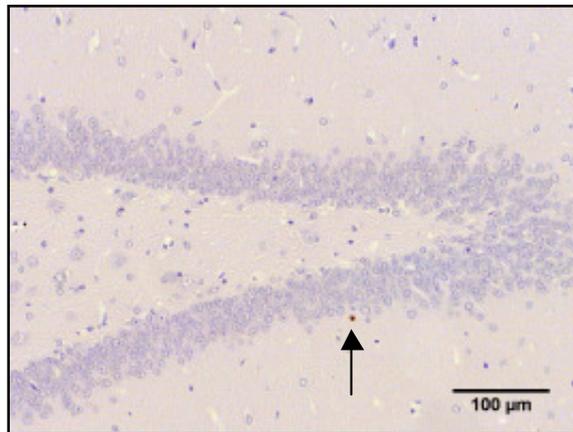


**Figure 36** : coloration hémalun-phloxine d'une coupe cérébrale (5  $\mu$ m d'épaisseur) de rat stressé et traité par la PB **A-** au niveau de la zone subgranulaire du gyrus dente de l'hippocampe et **B-** au niveau de la zone subventriculaire du striatum.

### 3.3.3- Détection de la mort cellulaire programmée par la technique TUNEL

Afin d'évaluer les conséquences du stress, du traitement ou de leur association sur la mort cellulaire par apoptose, la technique TUNEL a été réalisée sur des coupes cérébrales de 5 µm d'épaisseur. Deux zones cérébrales ont été retenues : la zone subventriculaire (SVZ) du striatum (Bregma -0,8 à -1,4), site important de neurogénèse et la zone subgranulaire (SGZ) de l'hippocampe (Bregma -2,56 à -3,6), structure impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

La **figure 37** illustre une cellule dite « TUNEL positive » détectée au niveau du gyrus dente de l'hippocampe d'un rat « témoin » sham-eau. A J22, soit 10 jours après arrêt du stress et du traitement, aucune différence de marquage n'est mise en évidence quel que soit le traitement ou le stress subi par l'animal. Ces résultats montrent que 10 jours après arrêt du stress et du traitement, aucun effet neuropathologique, traduit par une augmentation de l'apoptose, n'est détecté au niveau des structures étudiées.



**Figure 37** : détection de la mort cellulaire par apoptose au niveau d'une coupe (5 µm d'épaisseur) du gyrus dente de l'hippocampe d'un rat sham-eau. La flèche indique une cellule dite « TUNEL positive ».

### 3.3.4- Immunomarquage anti-BrdU

La prolifération cellulaire a été mesurée au niveau des deux zones d'intérêt choisies. La **figure 38** (présentée en page 109) illustre l'immunomarquage anti-BrdU au niveau de ces deux zones pour chacun des groupes d'animaux de cette étude.

De nombreuses cellules sont marquées au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) alors que très peu de cellules sont marquées au niveau de la zone subgranulaire (SGZ) de l'hippocampe. Un comptage du nombre de cellules marquées a été réalisé, au niveau de la SVZ du striatum, grâce au logiciel ImageJ (MacBiophotonics, USA, version 1.41). Le **tableau 11** présente le nombre de cellules marquées par mm<sup>2</sup>.

	Nombre de cellules par mm <sup>2</sup>
<b>Sham-eau</b>	282 ± 15
<b>Sham-PB</b>	296 ± 26
<b>Stress-eau</b>	289 ± 27
<b>Stress-PB</b>	296 ± 18

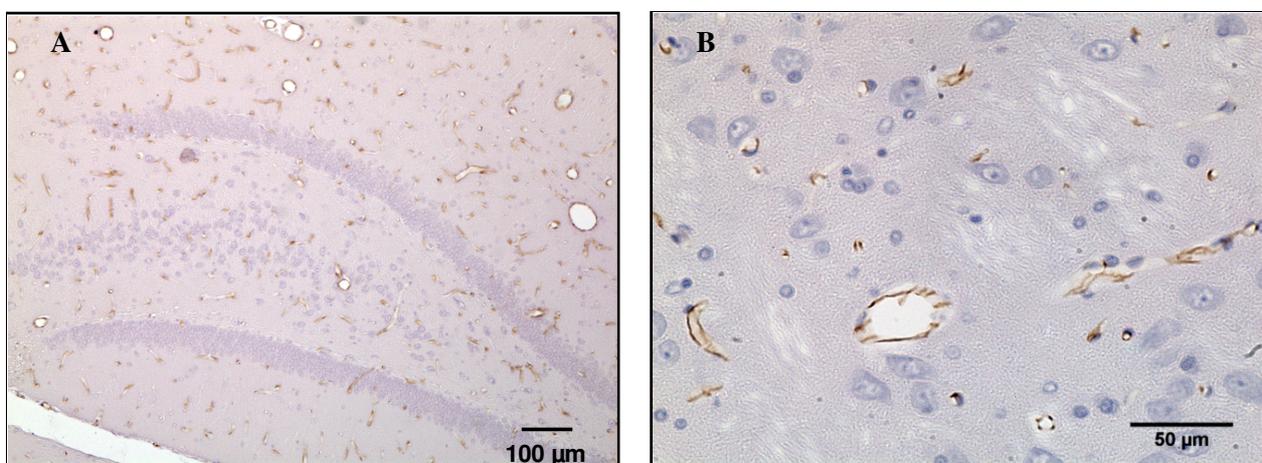
**Tableau 11** : nombre de cellules marquées par mm<sup>2</sup> au niveau de la zone SVZ du striatum suite à l'immunomarquage anti-BrdU sur des coupes cérébrales de rat (5 µm d'épaisseur). Les prélèvements ont été effectués 10 jours après arrêt du stress et du traitement. Les valeurs représentent la moyenne de chaque groupe ± SEM (n = 12 mesures par lot ; 2 coupes par lame, 2 SVZ par coupe et 3 rats par lot).

Le stress seul, le traitement par la PB seul et leur association n'induisent aucune modification du nombre de cellules marquées au niveau de ces deux zones à J22, soit 10 jours après l'arrêt du stress et du traitement, alors que nous observons un retard d'apprentissage dans le labyrinthe aquatique. L'absence de modification de la prolifération cellulaire est en accord avec les résultats obtenus concernant la détection des cellules en apoptose.

### 3.3.5 - Immunomarquage anti-Claudine 5

L'évaluation de l'intégrité de la BHE a été évaluée en réalisant un immunomarquage anti-claudine 5, marqueur des jonctions serrées. La figure 39 illustre une coupe (10 µm d'épaisseur) du gyrus dente de l'hippocampe (Bregma -2,56 à -3,6) d'un rat du lot sham-eau suite à cet immunomarquage.

Après observation microscopique, le stress, le traitement ou leur association ne se traduisent par aucune modification de la cohésion des jonctions serrées à J22, soit 10 jours après arrêt du stress et du traitement.



**Figure 39** : immunomarquage anti-claudine 5 d'une coupe (10 µm d'épaisseur) du gyrus dente de l'hippocampe d'un rat sham-eau (A- grossissement 20 et B- grossissement 40).

### 3.3.6 - Immunomarquage anti-albumine et anti-IgG

Afin d'estimer l'importance d'une éventuelle rupture de BHE induite par le stress, le traitement ou leur association, deux immunomarquages ont été réalisés avec deux anticorps dirigés contre des protéines sériques de poids moléculaire croissant : l'un dirigé contre l'albumine (poids moléculaire de 70 kDa) et l'autre contre l'IgG (poids moléculaire de 160 kDa). Les résultats obtenus pour un rat représentatif de chacun des quatre lots sont présentés sur la **figure 40** (présentée en page 110).

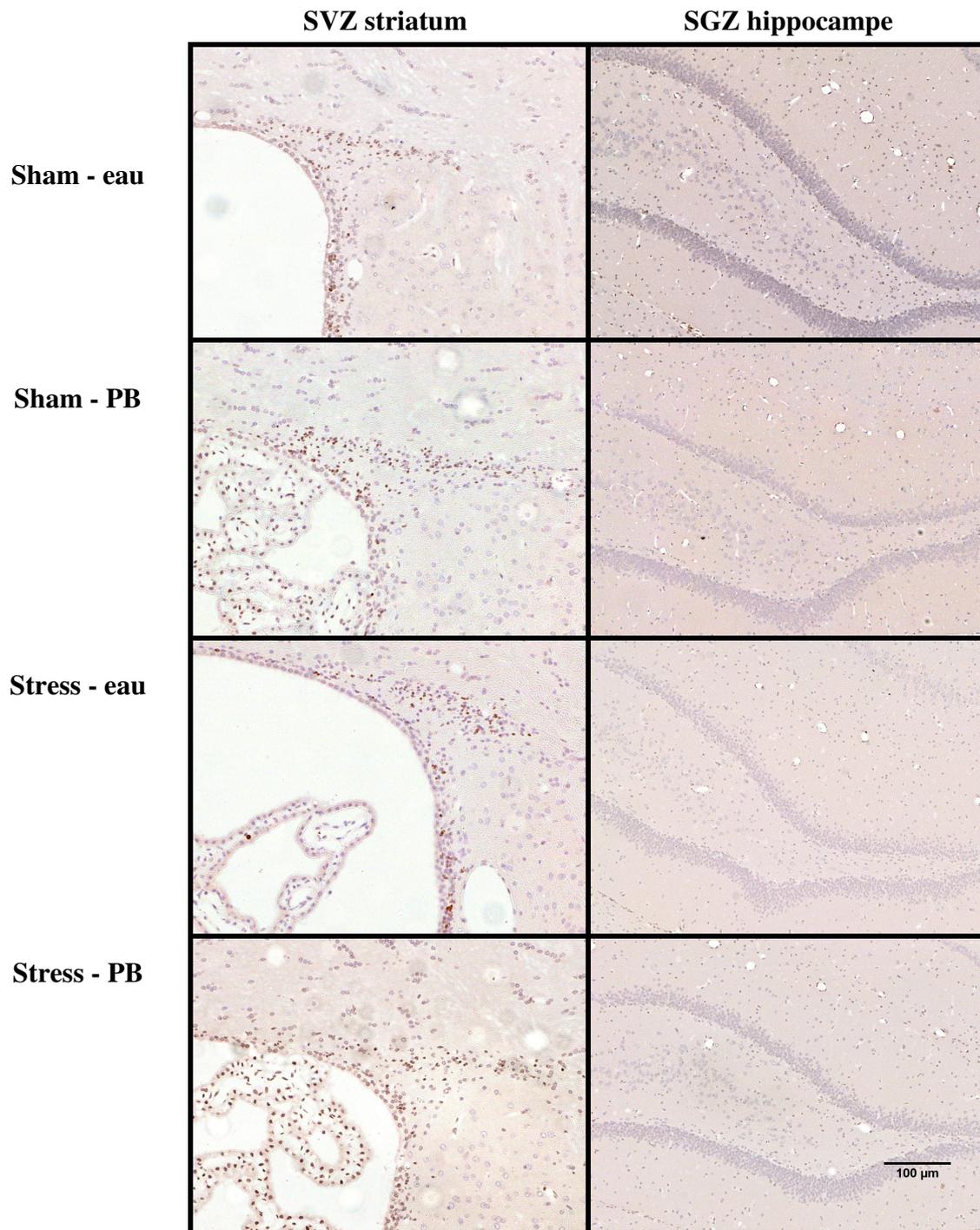
L'analyse microscopique de ces différents immunomarquages révèle que ni le stress, ni le traitement par la PB, ni leur association n'entraînent la diffusion des protéines sériques au niveau des deux zones ciblées. Ainsi, ni notre modèle de stress, ni le traitement ni la combinaison du stress et de la PB ne semblent induire d'ouverture de BHE observable 10 jours après la fin du stress et du traitement.

### 3.3.7 - Immunomarquage anti-AChE

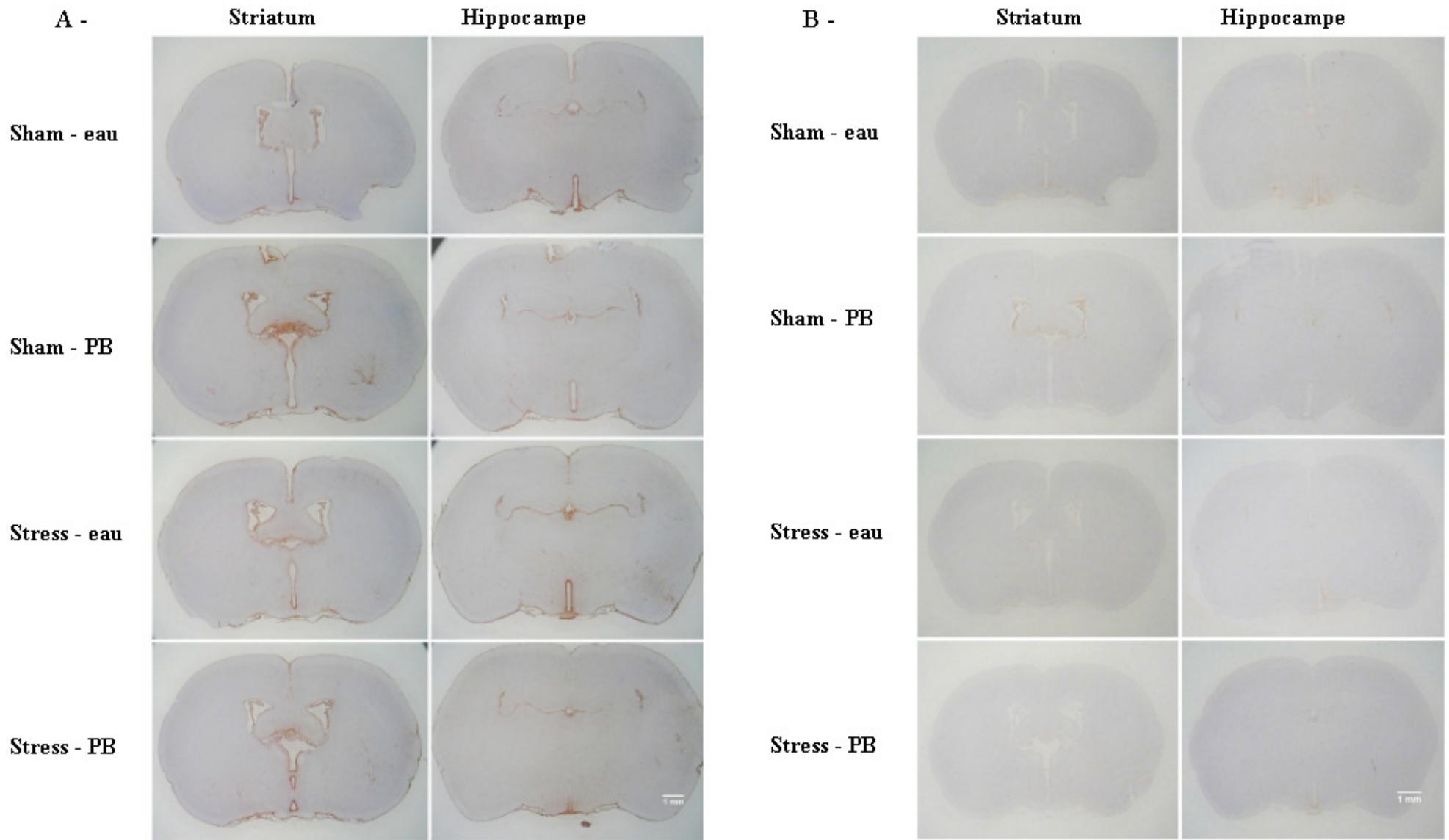
La pyridostigmine étant un anticholinestérasique, nous nous sommes intéressés à la quantification de la protéine AChE au niveau du striatum et de l'hippocampe, nos deux zones d'intérêt.

Les **figures 41 et 42** (présentées en pages 111 et 112) illustrent l'immunomarquage anti-AChE au niveau de coupes cérébrales (5 µm d'épaisseur) de rats représentatifs des différents lots. La **figure 41** présente les résultats obtenus pour le striatum postérieur et la **figure 42** ceux obtenus au niveau de l'hippocampe. A J22, soit 10 jours après arrêt du stress et du traitement, le stress seul, la PB seule ou leur association n'influencent pas la quantification de la protéine AChE ni au niveau du striatum ni au niveau de l'hippocampe.

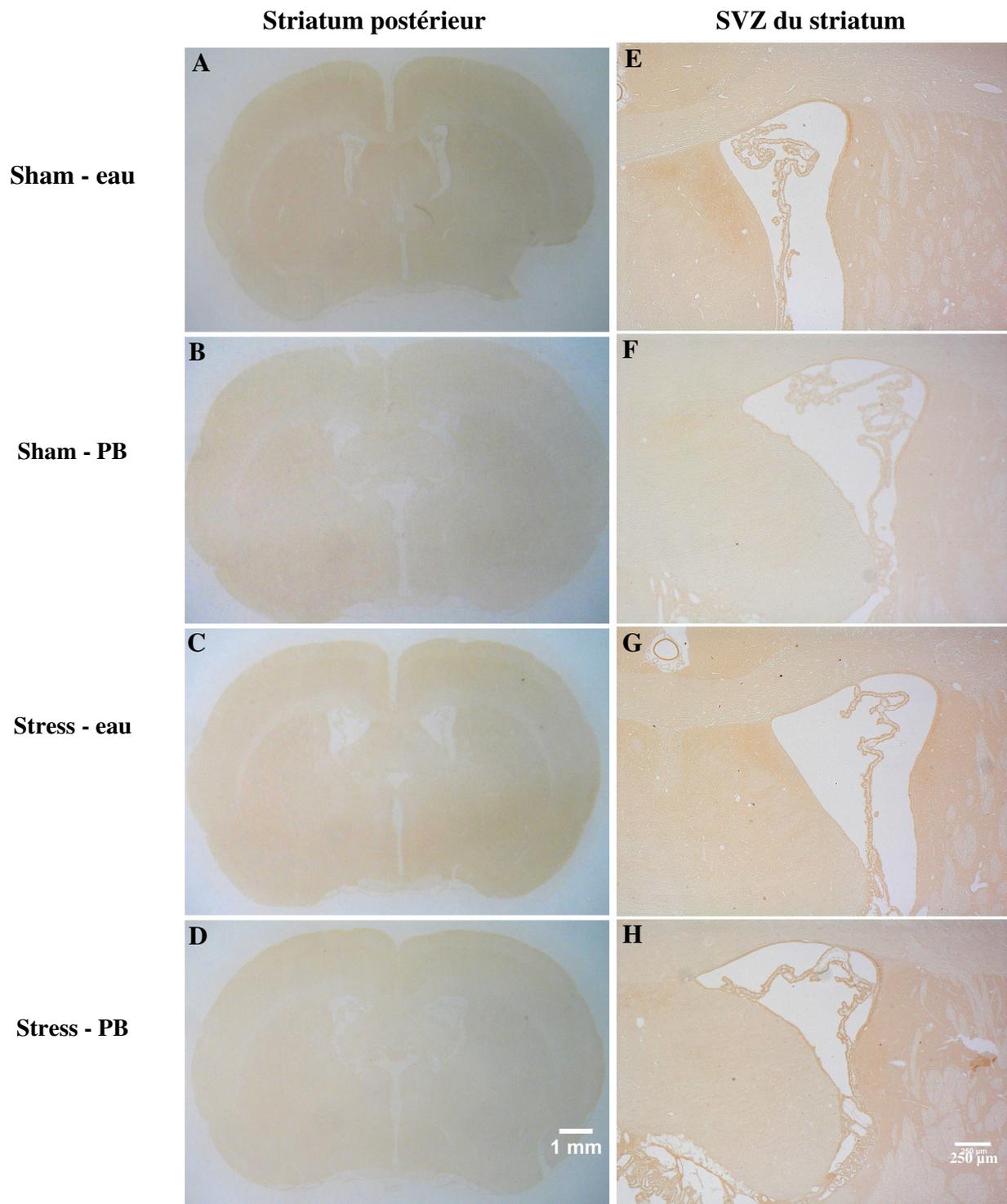
*En résumé, au niveau du striatum comme de l'hippocampe et avec les marqueurs choisis, le stress, le traitement par la PB ou leur association n'induisent ni modification histologique ni mort cellulaire à J22, soit 10 jours après arrêt du stress et du traitement. Par ailleurs, à ce délai, l'immunomarquage anti-claudine 5 ne révèle aucune perturbation de l'intégrité de la BHE ; cet effet est confirmé par l'absence d'entrée d'albumine ou d'IgG au niveau du striatum et de l'hippocampe. Finalement, l'immunomarquage anti-AChE révèle que ni le stress, ni la PB ni leur association n'ont de conséquence sur la quantité de la protéine à J22.*



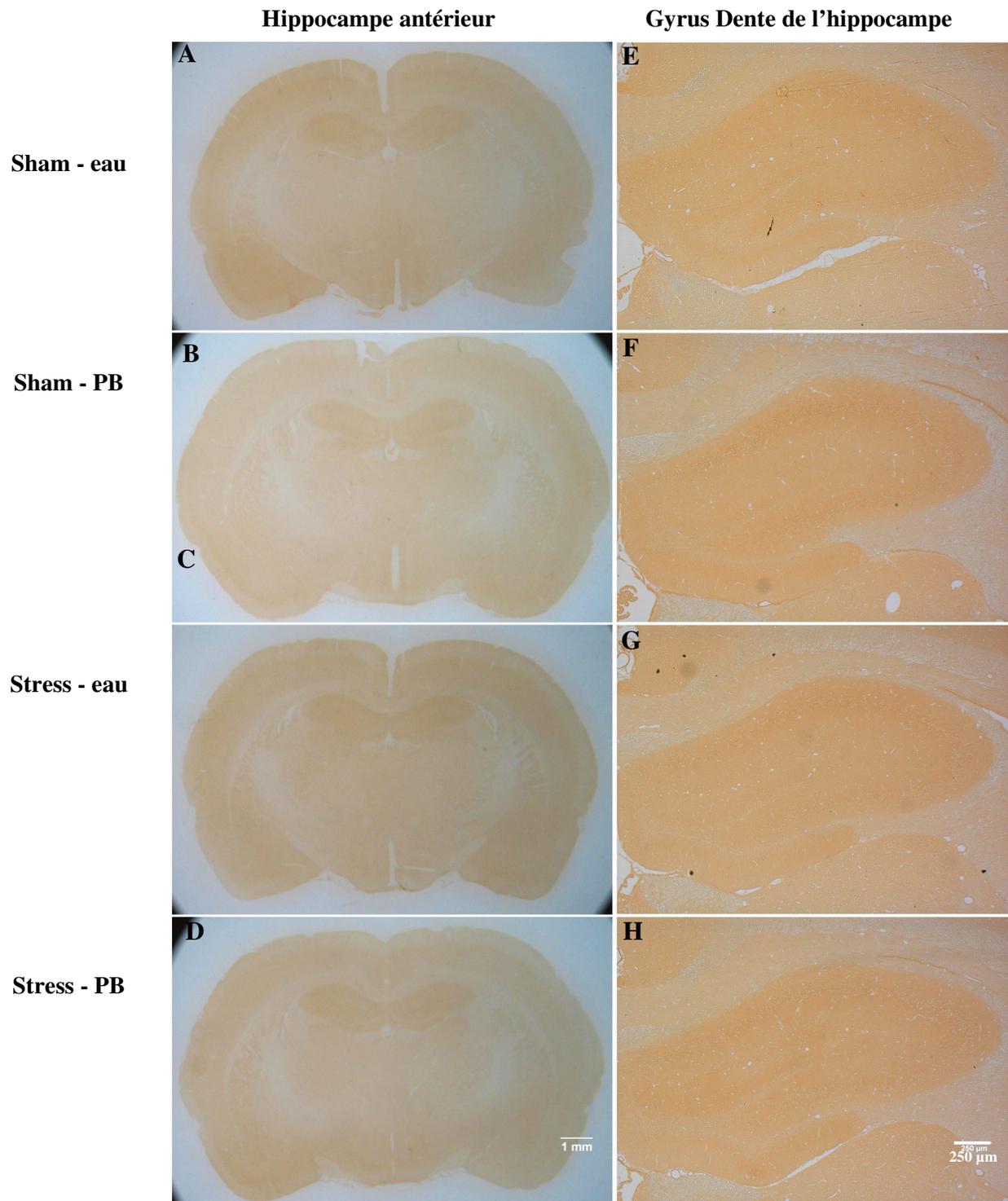
**Figure 38** : immunomarquage anti-BrdU d'une coupe cérébrale de Rat (5 µm d'épaisseur) au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) du striatum et de la zone subgranulaire (SGZ) de l'hippocampe des différents groupes d'animaux. Les cellules en prolifération sont marquées en marron.



**Figure 40** : immunomarquage anti-albumine (A) et anti-IgG (B) de coupes cérébrales (5  $\mu$ m) d'un rat représentatif de chacun des quatre lots. Pour chaque immunomarquage, une coupe de chacune des deux zones d'intérêt est présentée.



**Figure 41** : immunomarquage anti-AChE d'une coupe cérébrale de Rat (5 μm d'épaisseur) au niveau du striatum postérieur des différents groupes d'animaux (A à D) et leur grossissement au niveau de la zone subventriculaire (SVZ) du striatum (E à H).



**Figure 42** : immunomarquage anti-AChE d'une coupe cérébrale de Rat (5 μm d'épaisseur) au niveau de l'hippocampe antérieur des différents groupes d'animaux (A à D) et leur grossissement au niveau de l'hippocampe (E à H).

### **3.4- Conséquences moléculaires semi-retardées du stress et du traitement par la pyridostigmine**

Nous rappelons que le but de cette expérimentation est d'évaluer les conséquences moléculaires persistantes du stress comme du traitement par la PB.

Lors de cette expérimentation, la technique des « pools » n'était pas encore mise au point au laboratoire. La détermination de l'expression des différents gènes a donc été réalisée pour tous les échantillons. Ultérieurement, la technique dite « des pools » a été développée et utilisée lors de notre troisième expérimentation. Les résultats présentés dans le **tableau 12** représentent l'expression des ARNm (en unités arbitraires) des différents gènes évaluée échantillon par échantillon dans les différentes structures cérébrales prélevées à J22.

Au vu des résultats présentés dans le tableau ci-dessous, l'application du PCA comme le traitement par la PB n'induisent aucune modification semi-retardée de l'expression des différents gènes étudiés au niveau des 4 structures cérébrales choisies. Il faut cependant garder à l'esprit que le stress induit par le PCA, tout comme le traitement par la PB, peuvent éventuellement modifier l'expression de gènes à des délais plus précoces que celui retenu pour cette étude.

#### **Conclusion de l'expérimentation II :**

*Cette expérimentation a permis de mettre en évidence les faits suivants :*

- *Si le PCA seul ou le traitement par la PB seul n'induisent aucun effet sur les capacités d'apprentissage des animaux dans un test de labyrinthe aquatique, leur association apparaît comme délétère pour ces capacités. Cependant les rats continuent à apprendre puisque le temps de parcours des animaux de ce groupe diminue jour après jour et qu'ils ne font pas plus d'erreurs que les animaux des trois autres lots. On parlera donc plutôt d'un retard d'apprentissage.*
- *le stress seul, le traitement seul ou leur association n'induisent aucune conséquence cellulaire ou moléculaire au délai J22, soit 10 jours après la fin du stress et du traitement par la PB, pour les gènes et les anticorps retenus pour cette étude.*

Cette expérimentation ne révélant aucun effet semi-retardé aussi bien au niveau histologique que moléculaire, une nouvelle étude a alors été conduite afin d'identifier les gènes dont l'expression pourrait être modifiée précocement par le PCA, par le traitement ou leur association.

Lot	Structure cérébrale	AChE	cFos	cJun	GFAP	S100 $\beta$
Sham-eau	HY	1,19 $\pm$ 0,07	1,21 $\pm$ 0,06	1,22 $\pm$ 0,10	1,15 $\pm$ 0,15	1,03 $\pm$ 0,08
	Hpc	0,95 $\pm$ 0,04	1,08 $\pm$ 0,07	1,29 $\pm$ 0,12	1,18 $\pm$ 0,02	1,02 $\pm$ 0,04
	CxF	0,87 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,06	1,65 $\pm$ 0,13	0,83 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,03
	St	1,13 $\pm$ 0,06	0,79 $\pm$ 0,11	1,39 $\pm$ 0,23	1,27 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,06
Sham-PB	HY	1,00 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,18	1,07 $\pm$ 0,10	1,12 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,06
	Hpc	1,03 $\pm$ 0,03	0,94 $\pm$ 0,18	1,35 $\pm$ 0,16	1,10 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,04
	CxF	0,93 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,16	1,47 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,05	0,97 $\pm$ 0,06
	St	0,97 $\pm$ 0,12	0,82 $\pm$ 0,15	1,40 $\pm$ 0,20	1,17 $\pm$ 0,10	1,05 $\pm$ 0,07
Stress-eau	HY	1,04 $\pm$ 0,04	0,97 $\pm$ 0,16	1,08 $\pm$ 0,13	1,02 $\pm$ 0,19	0,89 $\pm$ 0,07
	Hpc	0,92 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,08	1,36 $\pm$ 0,09	0,97 $\pm$ 0,10	1,03 $\pm$ 0,09
	CxF	0,97 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,14	1,41 $\pm$ 0,20	0,84 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,02
	St	0,99 $\pm$ 0,10	0,90 $\pm$ 0,18	1,24 $\pm$ 0,15	1,19 $\pm$ 0,11	1,02 $\pm$ 0,02
Stress-PB	HY	1,02 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,16	1,15 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,05
	Hpc	0,99 $\pm$ 0,06	0,97 $\pm$ 0,12	1,34 $\pm$ 0,05	0,95 $\pm$ 0,07	1,02 $\pm$ 0,04
	CxF	0,94 $\pm$ 0,05	0,87 $\pm$ 0,13	1,54 $\pm$ 0,15	0,84 $\pm$ 0,08	1,01 $\pm$ 0,07
	St	0,98 $\pm$ 0,11	0,93 $\pm$ 0,19	1,52 $\pm$ 0,19	1,35 $\pm$ 0,07	0,99 $\pm$ 0,08

**Tableau 12:** expression, à J22, des ARNm de différents gènes au niveau de l'hypothalamus (HY), de l'hippocampe (Hpc), du cortex frontal (CxF) et du striatum (St) des animaux des quatre lots expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires et représentent la moyenne  $\pm$  SEM des animaux des différents lots (n = 5 par lot).

#### **4) Expérimentation III : effets précoces de l'application répétée du PCA et de l'administration chronique de pyridostigmine**

Nous rappelons que le but de cette expérimentation est d'évaluer les conséquences moléculaires induites immédiatement après 10 jours de stress et de traitement. L'expression de différents gènes a été évaluée au niveau des structures cérébrales choisies et précédemment décrites. Cette expérimentation s'est déroulée en deux temps :

- dans un premier temps, les PCR ont été réalisées sur 4 pools correspondant à nos 4 lots d'animaux et ce, pour chaque structure cérébrale choisie (hypothalamus, hippocampe, striatum et

cortex frontal). Lors de cette analyse moléculaire, les PCR de chaque pool ont été réalisées en duplicates ;

- dans un second temps, nous avons évalué individuellement l'expression des gènes suivants : Hsp70, I-κB, Il-1α, MR, GR, CamKIIα, BDNF et TrkB. La transcription de ces différents gènes semblait en effet modifiée lors des PCR sur pools. Par ailleurs, nous avons choisi d'étudier d'autres gènes dont l'expression pourrait être modulée par 10 jours de stress et de traitement, en réalisant les PCR directement sur échantillons : c-Fos, c-Jun et AChE. Nous avons limité cette étude à deux structures : l'hypothalamus, pour son implication dans l'activation et la régulation de l'axe HPA, et l'hippocampe, structure particulièrement sensible au stress et jouant un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

#### 4.1- Modulation de l'expression génique observée au niveau des pools

Il est à noter que l'Il-1 est une cytokine pro-inflammatoire dont la voie de signalisation peut être activée suite à la liaison de l'Il-1α ou de l'Il-1β sur leur récepteur Il-1R1. Lors de cette étude, il nous a été impossible de détecter l'expression d'Il-1β ; seuls les résultats concernant l'expression d'Il-1α sont donc présentés.

##### 4.1.1 - Expression génique au niveau de l'hypothalamus

Le **tableau 13** présente l'expression des différents gènes choisis au niveau de l'hypothalamus des animaux des 4 pools, juste après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les valeurs sont présentées comme la moyenne en unités arbitraires (UA) des deux duplicates obtenus.

	<b>Hsp70</b>	<b>I-κB</b>	<b>Il-1α</b>	<b>CamKIIα</b>	<b>BDNF</b>	<b>TrkB</b>	<b>MR</b>	<b>GR</b>	<b>MCIP1</b>	<b>CRF</b>
<b>Sham-eau</b>	0,30 (0,4-0,2)	0,96 (0,94-0,99)	1,37 (1,39-1,34)	1,22 (1,2-1,24)	1,13 (1,16-1,12)	1,22 (1,2-1,24)	0,98 (1-0,96)	1,12 (1,12-0,08)	1,23 (1,22-1,24)	0,14 (0,18-0,09)
<b>Sham-PB</b>	0,45 (0,44-0,46)	0,80 (0,76-0,84)	1,45 (1,48-1,42)	1,25 (1,2-1,3)	1,09 (1,1-1,08)	1,15 (1,2-1,1)	<b>1,25</b> (1,2-1,3)	1,15 (1-1,3)	1,24 (1,3-1,18)	0,15 (0,2-0,1)
<b>Stress-eau</b>	<b>1,5</b> (1,5-1,5)	<b>1,25</b> (1,24-1,27)	<b>0,92</b> (0,89-0,94)	1,20 (1,13-1,28)	1,08 (1,12-1,04)	1,00 (1,1-0,9)	0,84 (0,88-0,80)	1,10 (1-1,2)	1,26 (1,17-1,34)	0,17 (0,13-0,21)
<b>Stress-PB</b>	<b>1,25</b> (1,2-1,3)	<b>1,26</b> (1,24-1,28)	<b>1,1</b> (1,1-1,1)	1,26 (1,28-1,24)	1,00 (0,95-1,05)	1,16 (1,13-1,19)	<b>1,17</b> (1,1-1,23)	1,16 (1,2-1,12)	1,26 (1,3-1,22)	0,16 (0,19-0,13)

**Tableau 13** : modulation de l'expression des ARNm des différents gènes au niveau de l'hypothalamus des 4 lots expérimentaux. Les valeurs, exprimées en unités arbitraires, représentent la moyenne des duplicates obtenue pour chaque pool, ainsi que les valeurs de chacun des duplicates.

Au niveau de l'hypothalamus, le test PCA induit une augmentation de l'expression des ARNm Hsp70 et I-κB chez les animaux des 2 pools « stress ». Par ailleurs, ces animaux semblent présenter une expression de l'ARNm Il-1α plus faible que les rats des pools « sham ».

L'expression des ARNm codant pour CamKIIα, BDNF, TrkB, du CRF et MCIP1 n'est modifiée ni par le test PCA ni par le traitement par la PB ni par leur association. Par contre, il semble que la PB augmente l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) sans affecter celle des GR.

#### 4.1.2 - Expression génique au niveau de l'hippocampe

Le **tableau 14** présente les différences d'expression observées au niveau de l'hippocampe des animaux des 4 lots, immédiatement après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les valeurs sont présentées comme la moyenne en unités arbitraires des deux duplicates obtenus.

Au niveau de l'hippocampe, le test PCA induit une augmentation de la transcription d'Hsp70 et d'I-κB chez les animaux des 2 pools « stress ».

L'activité transcriptionnelle de l'Il-1α, des MR, des GR, du CRF et de MCIP1 n'étant pas différente entre les 4 pools d'animaux, il semble donc que ni le stress, ni la PB, ni leur association ne modifient l'expression de ces gènes dans cette structure.

Par contre, il apparaît que l'association du stress et de la PB augmente l'activité transcriptionnelle des gènes CamKIIα, BDNF et TrkB au niveau de l'hippocampe alors que le stress seul ou le traitement seul ne modifie pas leur expression.

	<b>Hsp70</b>	<b>I-κB</b>	<b>Il-1α</b>	<b>CamKIIα</b>	<b>BDNF</b>	<b>TrkB</b>	<b>MR</b>	<b>GR</b>	<b>CRF</b>	<b>MCIP1</b>
<b>Sham-eau</b>	0,81 (0.84-0.78)	0,70 (0.75-0.65)	3,08 (3,1-3,06)	1,12 (1.14-1,1)	1,65 (1,7-1,6)	1,55 (1,55-1,6)	0,95 (0.9-1)	1,12 (1.1-1.15)	1,46 (1.47-1.45)	1,39 (1.4-1,38)
<b>Sham-PB</b>	0,66 (0.64-0.68)	0,77 (0.8-0.74)	3,10 (3,3-2,9)	1,05 (1,08-1,02)	1,02 (1-1,04)	1,59 (1,59-1,59)	1,05 (1-0.09)	1,15 (1,3-1.2)	1,46 (1,48-1.43)	1,37 (1,4-1.33)
<b>Stress-eau</b>	<b>1,93</b> (1,92-1,94)	<b>1,44</b> (1,47-1,39)	3,19 (3,18-3,2)	1,14 (1,15-1,13)	1,66 (1,68-1,64)	1,55 (1,57-1,54)	0,92 (0,94-0.9)	1,10 (1-1.2)	1,48 (1,5-1.46)	1,32 (1,2-1.44)
<b>Stress-PB</b>	<b>1,78</b> (1,79-1,77)	<b>1,45</b> (1,49-1,41)	2,91 (2,92-2,9)	<b>1,95</b> (1,9-2)	<b>2,22</b> (2,24-2,19)	<b>2,28</b> (2,25-2,3)	1,08 (1,1-1.06)	1,16 (1,14-1.18)	1,44 (1,48-1.39)	1,30 (1,28-1.32)

**Tableau 14** : modulation de l'expression des ARNm des différents gènes au niveau de l'hippocampe des 4 lots expérimentaux. Les valeurs, exprimées en unités arbitraires, correspondent à la moyenne des duplicates obtenue pour chaque pool, ainsi que les valeurs de chacun des duplicates.

4.1.3 - Expression génique au niveau du cortex frontal

Le **tableau 15** présente les différences d'expression observées au niveau du cortex frontal des animaux des 4 lots, juste après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les valeurs sont présentées comme la moyenne en unités arbitraires des deux duplicatas obtenus.

	<b>Hsp70</b>	<b>I-κB</b>	<b>Il-1α</b>	<b>CamKIIα</b>	<b>BDNF</b>	<b>TrkB</b>	<b>MR</b>	<b>GR</b>	<b>CRF</b>	<b>MCIP1</b>
<b>Sham-eau</b>	0,31 (0,30-0,32)	0,60 (0,5-0,7)	ND	0,55 (0,58-0,51)	0,83 (0,8-0,86)	0,74 (0,77-0,71)	0,93 (0,92-0,94)	0,87 (0,86-0,88)	ND	ND
<b>Sham-PB</b>	0,26 (0,26-0,26)	0,60 (0,68-0,52)	ND	0,53 (0,4-0,65)	0,82 (0,8-0,84)	0,71 (0,78-0,64)	0,94 (0,98-0,9)	0,83 (0,75-0,9)	ND	ND
<b>Stress-eau</b>	<b>1,33</b> (1,25-1,40)	<b>1,02</b> (1,02-1,01)	ND	<b>0,65</b> (0,7-0,6)	0,81 (0,85-0,77)	<b>1,05</b> (1,06-1,04)	0,91 (1-0,85)	0,89 (0,89-0,89)	ND	ND
<b>Stress-PB</b>	<b>1,27</b> (1,25-1,3)	<b>1,13</b> (1,17-1,09)	ND	<b>0,65</b> (0,67-0,62)	0,89 (0,83-0,94)	<b>1,09</b> (1,14-1,05)	0,90 (1-0,8)	0,91 (0,96-0,85)	ND	ND

**Tableau 15 :** modulation de l'expression des ARNm de différents gènes au niveau du cortex frontal des 4 lots expérimentaux I. Les valeurs, exprimées en UA, correspondent à la moyenne des duplicatas obtenue pour chaque pool, ainsi que les valeurs de chacun des duplicatas. ND, non déterminé.

Au niveau du cortex frontal, le test PCA induit une augmentation de l'expression des ARNm Hsp70 et I-κB chez les animaux des 2 pools « stress ».

L'expression des ARNm des MR comme des GR n'étant pas significativement différente entre les 4 pools d'animaux, il semble que ni le stress, ni le pré-traitement par la PB, ni leur association ne modifient l'expression de ces gènes dans le cortex frontal.

Par ailleurs, l'expression de l'Il-1α, du CRF et de MCIP1 n'a pu être détectée au niveau de cette structure cérébrale, sans doute en raison d'une très faible expression corticale de ces messagers.

Il semble que le stress augmente l'activité transcriptionnelle de CamKIIα et TrkB au niveau du cortex frontal. Le traitement par la PB n'a aucun effet sur cette tendance.

4.1.4 - Résultats de l'expression génique au niveau du striatum

Le **tableau 16** présente les différences d'expression observées au niveau du striatum des animaux des 4 lots, immédiatement après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les valeurs sont présentées comme la moyenne en unités arbitraires.

	Hsp70	I-κB	Il-1α	BDNF	CamKIIα	TrkB	MR	GR	CRF	MCIP1
<b>Sham-eau</b>	0,74 (0,72-0,76)	0,70 (0,71-0,69)	ND	1,10 (1,15-1,05)	1,30 (1,32-1,28)	1,26 (1,26-1,27)	1,46 (1,42-1,5)	1,17 (1,14-1,2)	ND	ND
<b>Sham-PB</b>	0,54 (0,5-0,57)	0,61 (0,54-0,67)	ND	1,20 (1,25-1,15)	1,25 (1,3-1,2)	1,30 (1,28-1,32)	1,42 (1,33-1,5)	1,18 (1,14-1,22)	ND	ND
<b>Stress-eau</b>	<b>2,69</b> (2,51-2,87)	<b>1,5</b> (1,7-1,3)	ND	1,27 (1,2-1,34)	1,33 (1,36-1,30)	1,30 (1,27-1,33)	1,42 (1,42-1,4)	1,12 (1,04-1,19)	ND	ND
<b>Stress-PB</b>	<b>2,15</b> (2,17-2,12)	<b>1,39</b> (1,4-1,39)	ND	1,10 (0,96-0,89)	1,28 (1,27-1,28)	1,34 (1,33-1,36)	1,45 (1,5-1,39)	1,10 (1,2-1)	ND	ND

**Tableau 16 :** modulation de l'expression des ARNm de différents gènes au niveau du striatum des 4 lots expérimentaux. Les valeurs, exprimées en unités arbitraires, correspondent à la moyenne des duplicatas obtenue pour chaque pool, ainsi que les valeurs de chacun des duplicatas. ND, non déterminé.

Au niveau du striatum, le test PCA induit une augmentation de l'expression des ARNm Hsp70 et I-κB chez les animaux des 2 pools « stress ».

Il apparaît que le stress seul, la PB seule ou leur association sont sans effet sur l'activité transcriptionnelle du BDNF, de CamKIIα, de TrkB ainsi que sur la transcription des deux récepteurs aux glucocorticoïdes. En effet, l'expression de ces différents gènes n'est pas différente selon le pool pris en compte.

Par ailleurs, l'expression de l'Il-1α, du CRF et de MCIP1 n'a pu être détectée au niveau de cette structure cérébrale, sans doute en raison d'une très faible expression de ces messagers au niveau du striatum.

*Alors que l'expression des différents gènes étudiés n'est modulée ni par le stress, ni par la PB, ni par leur association à J22, nos résultats montrent un effet aux délais précoces. En effet, à J12, soit immédiatement après la dernière séance de PCA et le dernier traitement par la PB, ces deux facteurs ou leur association conduisent à la modulation de l'expression des ARNm de différents gènes.*

*Il apparaît que le test PCA induit un changement d'activité transcriptionnelle des gènes dont l'expression est affectée par le stress (Hsp70, I-κB) au niveau de toutes les structures cérébrales étudiées. De plus, l'application de ce test semble diminuer la transcription de l'Il-1α hypothalamique.*

*Le traitement par la PB semble, quant à lui, induire une augmentation de la transcription des récepteurs aux minéralocorticoïdes sans affecter celle des récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau de l'hypothalamus.*

Finalemment, l'association du stress et du traitement par la PB augmente l'expression de trois gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (i.e *CamKII $\alpha$* , *BDNF*, *TrkB*) au niveau de l'hippocampe.

#### 4.2- Expression génique mesurée pour chaque échantillon

Au vu des résultats sur pools, nous avons évalué l'expression des différents gènes décrits ci-dessus au niveau de deux structures cérébrales que sont l'hypothalamus (HY) et l'hippocampe (Hpc). Les résultats présentés ci-dessous sont obtenus suite aux PCR conduites dans les conditions optimales déterminées lors des mises au point.

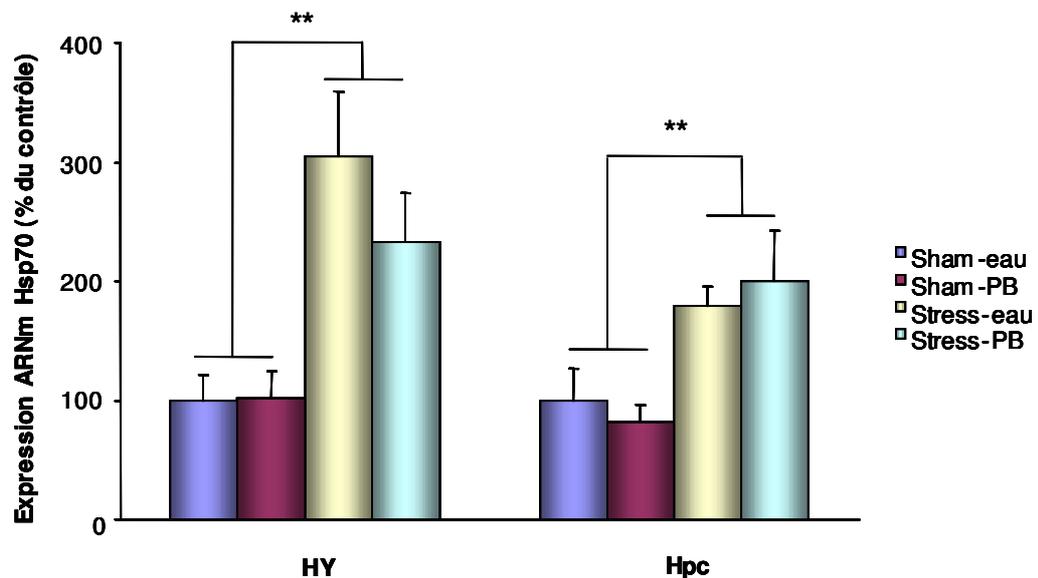
##### 4.2.1 - Expression de gènes modulés par le stress

###### Evolution de l'expression d'Hsp70

La **figure 43** présente les effets du stress, de la PB ou de leur association sur l'expression des ARNm Hsp70 au niveau de l'hypothalamus (HY) et de l'hippocampe (Hpc). Les valeurs sont présentées en pourcentage du contrôle (lot « sham-eau »).

L'expression d'Hsp70 est augmentée de façon significative d'un facteur 2,7 et 1,7 au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe, respectivement ( $p < 0,01$ , stress vs sham ; test NK).

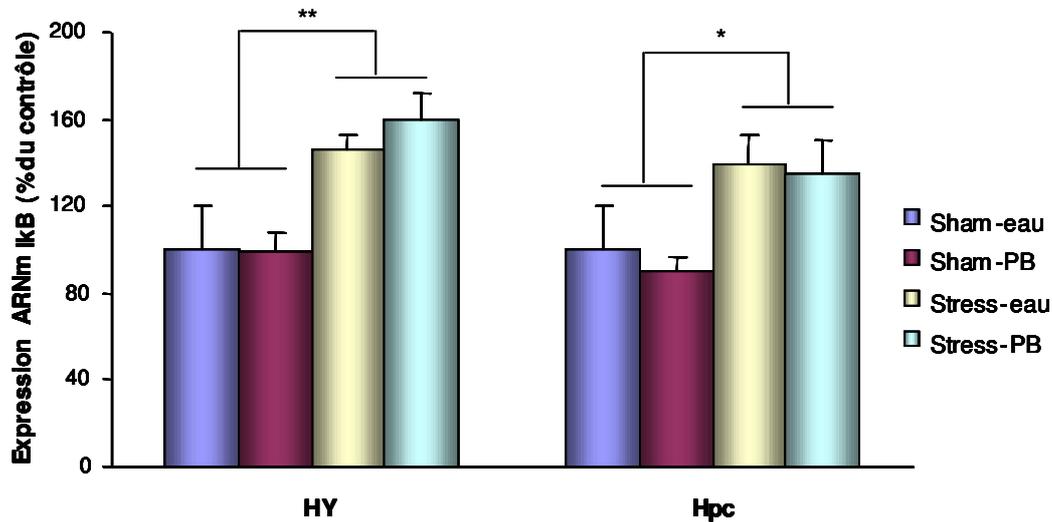
Le traitement par la PB n'induit aucun effet sur l'expression d'Hsp70 dans les deux structures cérébrales étudiées que les animaux soient stressés ou non. L'analyse statistique ANOVA suivie du test post-hoc de NK révèle que les effets du stress ne sont pas modifiés par la PB.



**Figure 43** : modulation de l'expression des ARNm Hsp70 par le stress au niveau de l'HY et de l'Hpc. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (« sham-eau »)  $\pm$  SEM (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*\*,  $p < 0,01$  ; stress vs sham, test NK).

Evolution de l'expression d'I- $\kappa$ B

La **figure 44** présente les effets du stress, de la PB ou de leur association sur l'expression des ARNm I- $\kappa$ B au niveau de l'hypothalamus (HY) et de l'hippocampe (Hpc). Les valeurs sont présentées en pourcentage du contrôle, correspondant au lot « sham-eau ».



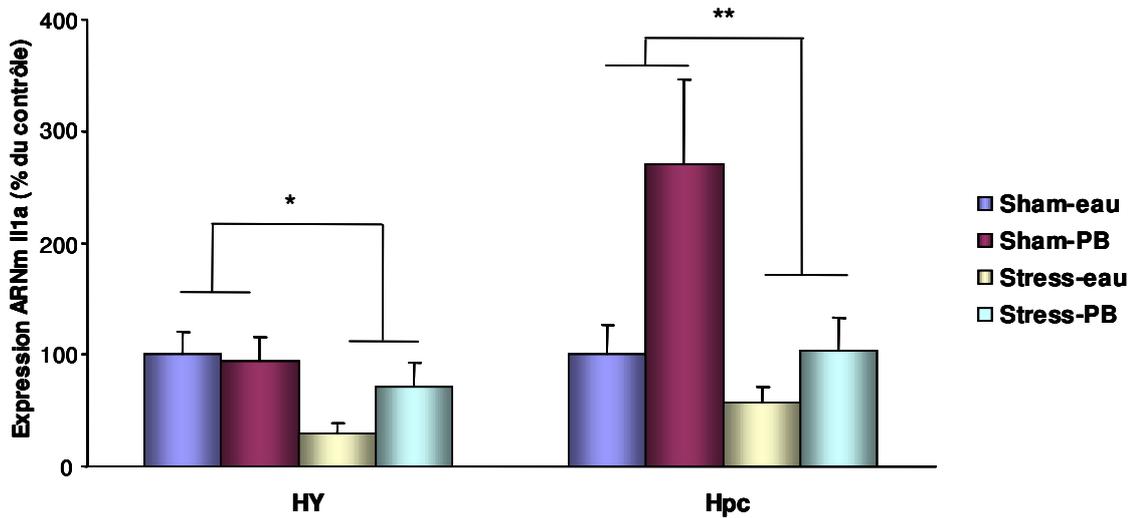
**Figure 44** : modulation de l'expression des ARNm I- $\kappa$ B par le stress au niveau de l'HY et de l'Hpc. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (« sham-eau »)  $\pm$  SEM (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*, p < 0,05 ; \*\*, p < 0,01, stress vs sham ; test NK).

Chez les animaux stressés, le profil d'expression d'I- $\kappa$ B est similaire à celui obtenu pour Hsp70 puisque le PCA se traduit par une augmentation significative de l'expression de ce gène dans l'hypothalamus (p < 0,01, stress vs sham ; test NK) d'un facteur 1,5 et au niveau de l'hippocampe (p < 0,05, stress vs sham ; test NK) d'un facteur 1,3.

4.2.2 - Expression de gènes impliqués dans l'activation de l'axe HPAEvolution de l'expression d'Il-1 $\alpha$ 

La **figure 45** présente les effets du stress, de la PB ou de leur association sur l'expression des ARNm Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus (HY) et de l'hippocampe (Hpc). Les valeurs sont présentées en pourcentage du contrôle, correspondant au lot « sham-eau ».

L'expression des ARNm codant pour l'Il-1 $\alpha$  est diminuée chez les animaux stressés au niveau de l'hypothalamus (p < 0,05, stress vs sham ; test NK) comme de l'hippocampe (p < 0,01, stress vs sham ; test NK). Cependant dans l'hippocampe, cet effet semble lié à une augmentation de la transcription d'Il-1 $\alpha$  sous l'effet de la PB seule. En effet, dans cette structure cérébrale la PB induit une augmentation de l'expression de l'ARNm Il-1 $\alpha$  (p < 0,05, sham-PB vs sham-eau, test NK) d'un facteur 2,5 chez les animaux non stressés.

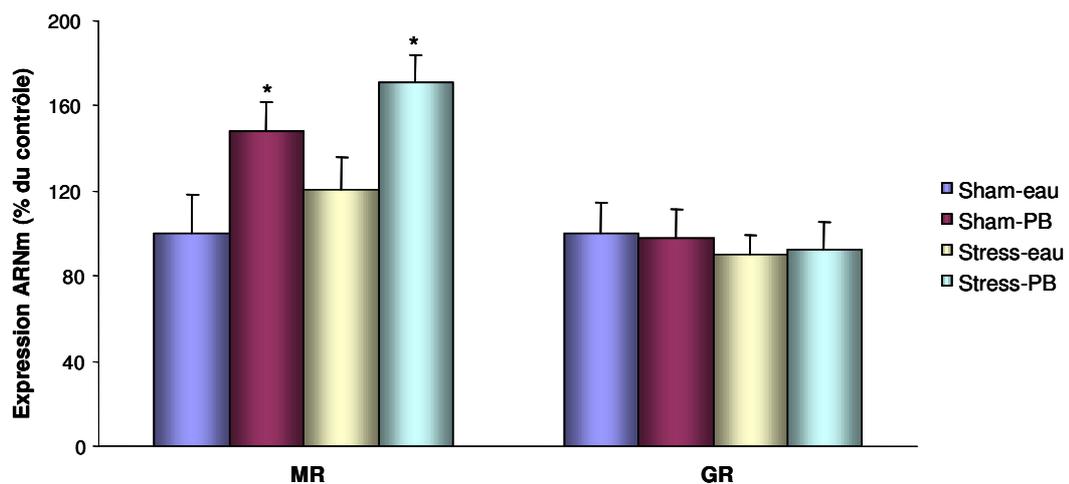


**Figure 45** : modulation de l'expression des ARNm d'Il-1 $\alpha$  par le stress au niveau de l'HY et par la PB au niveau de l'Hpc. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (« sham-eau »)  $\pm$  SEM (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*, p < 0,05 ; \*\*, p < 0,01, stress vs sham, test NK).

Au niveau de l'hypothalamus, la PB n'induit aucun effet sur la transcription de l'Il-1 $\alpha$ . Par contre, la diminution de l'expression d'Il-1 $\alpha$  induite par le stress tend à être atténuée sous l'effet de la PB (p = 0,13, stress-PB vs stress-eau, test NK) dans cette même structure.

*Evolution de l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes au niveau de l'hypothalamus*

La **figure 46** présente les effets du stress, de la PB ou de leur association sur l'expression des gènes codant pour les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) et aux glucocorticoïdes (GR) au niveau de l'hypothalamus. Les valeurs sont présentées en pourcentage du contrôle, correspondant au lot « sham-eau ».



**Figure 46** : modulation de l'expression des ARNm codant pour les MR et les GR par la PB au niveau de l'hypothalamus. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (« sham-eau »)  $\pm$  SEM (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*, p < 0,05 ; comparaison au lot sham-eau, test NK).

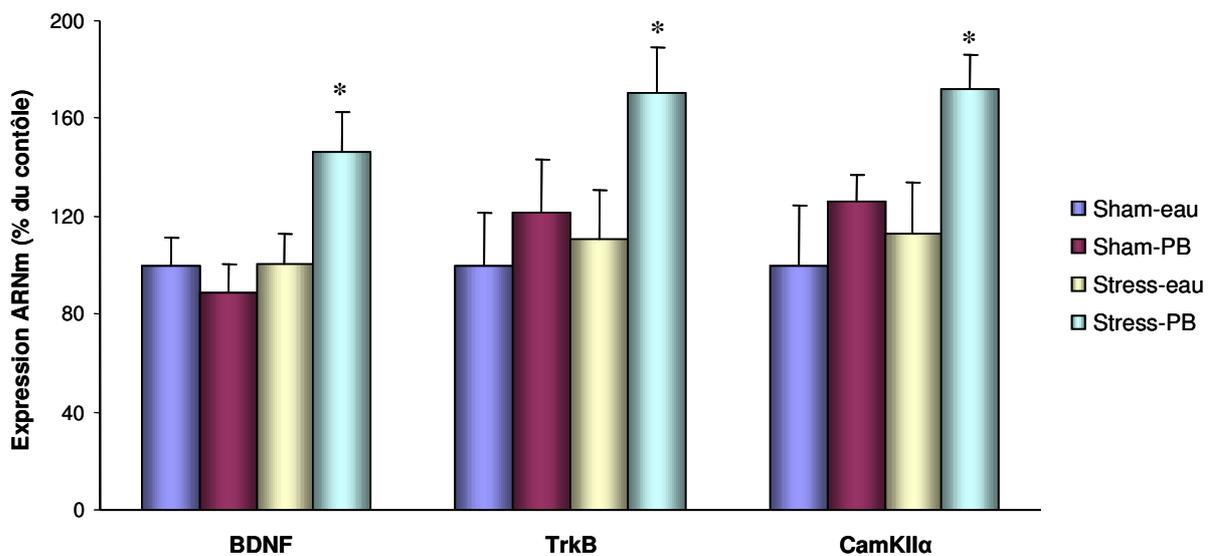
Au niveau de l'hypothalamus, le traitement par la PB induit une augmentation de l'expression des récepteurs MR chez les animaux stressés comme non-stressés ( $p < 0,05$ , sham-PB vs sham-eau et stress-PB vs sham-eau, test NK) d'un facteur 1,5. Les lots sham-eau et stress-eau n'étant pas significativement différents ( $p = 0,39$ , test NK), le traitement par la PB augmente l'activité transcriptionnelle des MR sans que cet effet ne soit modifié par le stress.

L'expression des récepteurs GR n'est modifiée ni par le stress ni par le traitement par la PB ni par leur association au niveau de l'hypothalamus.

Par ailleurs, l'expression de ces deux types de récepteurs n'est modulée ni par le stress, ni par la PB, ni par leur association au niveau de l'hippocampe suite à 10 jours de stress et de traitement (résultats non présentés).

#### 4.2.3 - Expression de gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation

La **figure 47** présente les effets du stress, de la PB ou de leur association sur l'expression des ARNm codant pour BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  au niveau de l'hippocampe. Les valeurs sont présentées en pourcentage du contrôle, correspondant au lot « sham-eau ».



**Figure 47** : modulation de l'expression des ARNm de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  par le stress associé à la PB au niveau de l'hippocampe. Les valeurs sont exprimées en pourcentage du contrôle (« sham-eau »)  $\pm$  SEM (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*,  $p < 0,05$  ; comparaison au lot sham-eau, test NK).

Les résultats présentés sur cette figure montrent que ni le stress ni la PB ne modifient l'expression des trois gènes dans l'hippocampe. Par contre, les animaux stressés recevant de la PB présentent une

augmentation de l'expression des ARNm de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  ( $p < 0,05$ , stress-PB vs sham-eau ; test NK).

Cet effet est spécifique à l'hippocampe puisque dans l'hypothalamus, l'expression de ces trois gènes n'est modulée ni par le stress ni par le traitement par la PB, ni par leur association (résultats non présentés).

*Au vu de ces résultats, il apparaît que les PCR réalisées sur échantillons individuels corroborent les résultats obtenus sur pools. En effet, le stress induit par le test PCA se traduit par une augmentation de la transcription d'Hsp70 et d'I- $\kappa$ B au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe et par une inhibition de l'expression d'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus. Par ailleurs, le traitement par la PB induit une augmentation de la transcription des MR au niveau de l'hypothalamus et, au niveau de l'hippocampe, une augmentation de l'expression de trois gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$ ) est observée lorsque le stress est associé au traitement.*

*Seule l'augmentation de l'expression d'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hippocampe suite au traitement par la PB n'a pu être détectée lors de notre analyse par PCR sur pools.*

#### 4.2.4 - Evolution de l'expression des ARNm codant pour c-Fos, c-Jun et AChE

##### Au niveau de l'hypothalamus

Le **tableau 17** présente les différences d'expression des ARNm c-Fos, c-Jun et AChE observées au niveau de l'hypothalamus des animaux des 4 lots, immédiatement après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les résultats sont présentés en unités arbitraires.

	AChE	c-Fos	c-Jun
<b>Sham-eau</b>	1,18 $\pm$ 0,10	0,74 $\pm$ 0,10	0,66 $\pm$ 0,16
<b>Sham-PB</b>	0,96 $\pm$ 0,08	0,87 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,12
<b>Stress-eau</b>	1,13 $\pm$ 0,04	1,39 $\pm$ 0,10 ***	1,20 $\pm$ 0,14 *
<b>Stress-PB</b>	1,03 $\pm$ 0,08	1,37 $\pm$ 0,15 ***	1,42 $\pm$ 0,11 **

**Tableau 17 :** expression, à J12, des ARNm codant pour l'AChE, c-Fos et c-Jun au niveau de l'hypothalamus des animaux des quatre lots expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires et représentent la moyenne  $\pm$  SEM des animaux des différents lots ( $n = 5-8$  par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; \*\*\*,  $p < 0,001$  ; comparaison au lot sham correspondant ; test NK).

Au niveau de l'hypothalamus, l'expression de l'ARNm codant pour l'AChE n'est modulée ni par le stress, ni par le traitement par la PB, ni par leur association.

Dans cette même structure, le stress se traduit par une augmentation significative de la transcription de c-Fos (\*\*\*,  $p < 0,001$ , comparaison au lot sham correspondant ; test NK) d'un facteur 1,8 chez les animaux non traités et d'un facteur 1,5 chez les animaux traités par la PB. Le traitement par la PB ne modifie pas l'expression de ce gène.

En ce qui concerne l'expression hypothalamique de c-Jun, le profil est similaire à celui observé pour c-Fos. En effet, l'application de 10 jours de PCA se traduit par une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de c-Jun (\*,  $p < 0,05$  ; \*\*,  $p < 0,01$  ; comparaison au lot sham correspondant ; test NK) d'un facteur 1,8 chez les animaux ne recevant pas la PB et d'un facteur 1,9 chez les animaux traités par la PB. Le traitement par la PB est sans effet sur la transcription de c-Jun et les effets du stress ne sont pas modifiés par la PB.

Au niveau de l'hippocampe

Le **tableau 18** présente les différences d'expression des ARNm c-Fos, c-Jun et AChE observées au niveau de l'hippocampe des animaux des 4 lots, immédiatement après la dernière séance de PCA et 1 heure après traitement par la PB. Les résultats sont présentés en unités arbitraires.

	AChE	c-Fos	c-Jun
<b>Sham-eau</b>	0,80 ± 0,12	0,56 ± 0,12	1,06 ± 0,16
<b>Sham-PB</b>	0,98 ± 0,08	0,54 ± 0,11	1,47 ± 0,13
<b>Stress-eau</b>	0,95 ± 0,08	1,70 ± 0,33 *	2,50 ± 0,04 *
<b>Stress-PB</b>	0,97 ± 0,08	1,77 ± 0,28 *	2,77 ± 0,14 *

**Tableau 18** : expression, à J12, des ARNm codant pour l'AChE, c-Fos et c-Jun au niveau de l'hippocampe des animaux des quatre lots expérimentaux. Les valeurs sont exprimées en unités arbitraires et représentent la moyenne ± SEM des animaux des différents lots (n = 5-8 par lot). Les différences statistiquement significatives sont présentées (\*,  $p < 0,05$  ; comparaison au lot sham correspondant ; test NK).

Au niveau de l'hippocampe, l'expression de l'ARNm codant pour l'AChE n'est modifiée ni par le stress, ni par le traitement par la PB, ni par leur association.

Dans cette même structure, le stress se traduit par une augmentation significative de l'expression de c-Fos (\*,  $p < 0,05$ , comparaison au lot sham correspondant ; test NK) d'un facteur 3 chez les animaux recevant ou non la PB. Le traitement par la PB ne modifie pas l'expression de ce gène.

Dans l'hippocampe, l'expression de l'ARNm codant pour c-Jun présente un profil similaire à celui observé pour c-Fos. En effet, l'application de 10 jours de PCA se traduit par une augmentation significative de l'activité transcriptionnelle de c-Jun (\*,  $p < 0,05$ , comparaison au lot sham correspondant ; test NK) d'un facteur 2,4 chez les animaux ne recevant pas la PB et d'un facteur 1,9 chez les animaux traités par la PB. Le traitement par la PB est sans effet sur la transcription de c-Jun et les effets du stress ne sont pas modifiés par la PB.

*En résumé, cette étude destinée à mettre en évidence les effets moléculaires précoces du stress et du traitement montre que :*

- *l'application du test PCA pendant 10 jours se traduit par une augmentation de l'activité transcriptionnelle de différents gènes dont l'expression est modulée par le stress (Hsp70, I- $\kappa$ B, c-Fos et c-Jun) ;*
- *si l'administration répétée de PB n'induit aucun effet sur l'expression du gène codant pour l'AChE, le même traitement se traduit par une augmentation de l'expression des ARNm codant pour les MR au niveau de l'hypothalamus ;*
- *l'association du stress et du traitement par la PB augmente l'expression de trois gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation au niveau de l'hippocampe, structure connue pour jouer un rôle important dans les processus mnésiques.*

#### **5) Synthèse des résultats**

En résumé, le modèle expérimental que nous avons développé apparaît comme un bon modèle pour mimer les conditions vécues par les soldats lors de la première guerre du Golfe. D'une part, le test PCA modifié induit bien un stress validé par la perte de poids, l'hypercorticotéronémie, l'hyperaldostéronémie ainsi que par l'augmentation de la transcription de gènes marqueurs du stress tels que Hsp70 et I- $\kappa$ B. De plus, les animaux ont mémorisé les conditions de stress comme en témoigne leur réaction lorsqu'ils sont placés dans la cage du PCA plusieurs mois après la fin du test. D'autre part, la posologie et la voie d'administration choisies pour le traitement par la PB se traduisent par une inhibition des activités ChE et AChE sanguines de l'ordre de 40% comme préconisé chez l'Homme dans le cadre du traitement prophylactique en cas de menace chimique.

L'administration répétée de PB (1,5 mg/kg/jour, *per os*) pendant 10 jours n'entraîne aucune inhibition des activités ChE et AChE au niveau des trois structures cérébrales étudiées (hippocampe, striatum, cortex frontal). Ceci suggère que la PB ne franchit pas massivement la BHE, que le traitement soit ou non associé au stress. Par contre, le test PCA se traduit par une inhibition des activités ChE et AChE au niveau du striatum.

Des effets secondaires sur l'expression génique sont observés immédiatement après la dernière séance de stress et de traitement par la PB. Les animaux soumis au test PCA présentent une réaction cellulaire au niveau du SNC reflétée par l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription c-Fos et de c-Jun. Par ailleurs, l'augmentation de la transcription d'Hsp70 et d'I- $\kappa$ B valide, d'un point de vue moléculaire, le test PCA modifié en tant que modèle de stress. L'administration orale de PB présente un impact limité sur l'expression des différents gènes étudiés au niveau de l'hypothalamus comme de l'hippocampe. Seule une augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour les récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) au niveau de l'hypothalamus a été mise en évidence. Cet effet permet d'envisager une modulation de la réponse au stress par la PB. Enfin, l'association du stress et de la PB se traduit par une augmentation de la transcription de différents gènes impliqués dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$ ). Cette augmentation de l'activité transcriptionnelle pourrait être liée aux déficits cognitifs observés ultérieurement.

En effet, lors du test du labyrinthe aquatique, réalisé au cours de la semaine suivant la fin du PCA, on observe que ni le stress ni le traitement quotidien par la PB ne modifient les capacités d'apprentissage des animaux. Par contre, l'association du stress et du traitement par la PB perturbe les fonctions cognitives des rats.

Trois jours après la fin du test d'apprentissage, nous n'observons aucune conséquence semi-retardée (J22) moléculaire ni histologique.

**- DISCUSSION -**



## Discussion

Dans la littérature, certaines études ont montré des effets de la pyridostigmine au niveau cérébral lorsque celle-ci est administrée en condition de stress ou en association avec d'autres substances chimiques potentiellement utilisées pendant la première guerre du Golfe. Pourtant, la prescription de pyridostigmine comme mesure prophylactique en cas de menace chimique ne peut, à l'heure actuelle, être remise en cause, particulièrement en cas de dispersion de soman. Dans un esprit de « pharmacovigilance », il semble donc nécessaire d'enrichir les connaissances sur les possibles effets secondaires de la molécule par des études expérimentales. Dans notre travail, les effets d'une administration répétée de PB associée à un stress ont été étudiés au niveau cérébral.

### 1) Validation du modèle

Pendant le conflit du Golfe, la prise de 30 mg de PB toutes les huit heures a été ordonnée par les Armées de différents pays. Cette dose a été choisie afin de protéger 20 à 40% des cholinestérases périphériques contre une inhibition irréversible par les neurotoxiques organophosphorés (Koplovitz et al. 1992). Lors de notre étude, la dose de 1,5 mg/kg de PB administrée *per os*, chez le Rat, conduit à une inhibition des activités ChE et AChE sanguines de l'ordre de 40%. Ce taux d'inhibition est similaire à celui observé par d'autres équipes administrant la même dose de PB, par la même voie d'administration, à des rats adultes Sprague-Dawley (Tian et al. 2002; Baireddy et al. 2007). L'équipe de Tian s'est intéressée aux effets de l'administration unique de PB immédiatement avant ou après l'application de deux types de stress (course et nage forcées). Dans les deux cas, le traitement par la PB, donné avant ou après le stress, induit une inhibition de l'activité ChE sanguine. Cependant cette inhibition est moindre lorsque le traitement est administré immédiatement avant le stress de nage forcée. Les auteurs ont alors émis l'hypothèse que la nage forcée puisse induire une hypothermie retardant l'absorption de la PB et donc son action. L'équipe de Baireddy a reproduit un protocole similaire à celui de l'équipe de Tian en s'intéressant aux effets de la PB administrée immédiatement après une séance de trois stress combinés (contention, course et nage forcées). Lors de cette étude, les animaux traités présentent une inhibition de l'activité ChE sanguine variant entre 42 et 50% deux heures après le traitement, que les animaux soient stressés ou non et quel que soit le stress.

Ce taux d'inhibition de l'activité ChE sanguine est celui choisi par de nombreux auteurs lors de différents protocoles cherchant à mimer les conditions de prise du pré-traitement par les soldats durant le conflit du Golfe. Ainsi, l'administration de PB (1,5 mg/kg/j, mini-pompes osmotiques) à des rats Sprague-Dawley conduit à une inhibition de l'activité AChE sanguine de l'ordre de 45% (Kant et al. 2001). De même, une inhibition de l'activité AChE sanguine de 40% est obtenue par Taysse et son

équipe administrant de la PB (0,2 mg/kg, *s.c.*) deux fois par jour pendant 5 jours à des souris (Taysse et al. 2005).

Lors de notre étude, la PB a été administrée par voie orale, par « gavage » à l'aide d'une canule. D'autres voies d'administration ont été envisagées telles que l'utilisation de mini-pompes osmotiques (Kant et al. 2001; Bernatova et al. 2003) ou l'administration *per os* par dilution de la PB dans l'eau de boisson (Servatius et al. 1998; Servatius et al. 2000; Scremin et al. 2003). Ces deux modes d'administration n'ont pas été retenus lors de nos expérimentations. En effet, la mini-pompe osmotique délivre le traitement en continu et aucune fluctuation des taux de PB dans le sang n'est alors détectée. Le choix du gavage comme voie d'administration permet d'observer un pic plasmatique de PB similaire à celui observé suite à la prise orale chez l'Homme. L'autre type d'administration (dissolution de PB dans l'eau de boisson) semblait peu appropriée puisqu'elle ne permet pas de contrôler la dose réellement administrée aux animaux ni le moment de la prise pour chaque animal. De plus, lors de ses travaux, l'équipe américaine de Servatius (Servatius et al. 2000) a mis en évidence une moindre prise de boisson lorsque les animaux sont traités par la PB. Cette technique présente donc deux inconvénients majeurs : la difficulté à définir quelle dose a réellement été prise par les animaux et l'impossibilité de comparer les animaux entre eux.

Nos expérimentations ont été conduites dans le but de mimer les conditions de prise du traitement prophylactique par les soldats. L'analyse bibliographique relative à ce sujet révèle que la plupart des auteurs ont réalisé un protocole comprenant une seule administration de PB par jour (van Haaren et al. 1999; Abou-Donia et al. 2001; Song et al. 2002; Abou-Donia 2003; Shaikh & Pope 2003; Abdel-Rahman et al. 2004). De façon similaire, nos animaux ont reçu 1,5 mg/kg de PB une fois par jour. Il est à noter que même si trois administrations de PB avaient été plus représentatives des conditions opérationnelles, ce protocole aurait été, en pratique, trop complexe à mettre en place.

Pour conclure, comme le montrent nos résultats, la dose ainsi que la voie d'administration que nous avons retenues pour notre modèle expérimental sont adaptées pour observer une inhibition de l'activité ChE périphérique similaire à celle recommandée par l'OTAN dans le cadre du traitement prophylactique en cas de menace chimique. Par ailleurs, le test PCA ne modifie pas l'inhibition périphérique induite par la PB, ce qui corrobore différents travaux étudiant les effets de la prise de PB associée à un stress (Kant et al. 2001; Shaikh & Pope 2003; Baireddy et al. 2007). Seuls les résultats publiés par l'équipe de Tian montrent un effet de la nage forcée sur les paramètres pharmacocinétiques d'absorption de la PB (Tian et al. 2002).

Lors de notre étude, nous avons utilisé une version modifiée d'un test d'apprentissage appelé Pole Climbing Avoidance (PCA) (Le Poncin-Lafitte et al. 1982) afin d'induire un stress. Dans le test standard, chacune des 5 séances quotidiennes est composée de 10 essais d'une durée d'une minute.

Les animaux font alors aisément le lien entre le son et le choc électrique puisque les auteurs observent des taux d'échappement augmentant jusqu'à atteindre 95% au dernier jour du test (Le Poncin-Lafitte et al. 1982). Lors de nos expérimentations durant lesquelles le nombre d'essais et de séances sont augmentés, les animaux présentent une diminution progressive du nombre d'essais par session. En d'autres termes, le rat « généralise » la réponse attendue en montant et descendant du mât à tout moment. De ce fait, le cycle de l'essai est interrompu, le système est réinitialisé et l'essai non comptabilisé. Peu à peu, la phase de repos initialement de 40 secondes est augmentée et le temps entre deux « sons » allongé. Au lieu d'attendre le stimulus auditif, le rat monte et descend du mât de façon inopinée. L'animal développe ainsi un comportement craintif et impulsif : « l'anticipation à tout prix ». De par son manque d'attention et de vigilance, le rat accumule les erreurs ; le taux d'échappement avoisine 60% au dernier jour du test au lieu de 95% dans le test classique (résultats non présentés). Cet effet peut être lié à l'augmentation du nombre de sessions mais également à la complexité du test qui nécessite deux réponses consécutives : (i) l'animal doit faire le lien entre le son et le choc électrique et (ii) le rat doit s'abstenir de monter au mât pendant la phase de repos. Dans l'incertitude (y aura-t-il un son et quand ?), l'animal présente différents signes comportementaux même en absence du stimulus stressant. Ainsi, dans l'attente de la survenue d'un éventuel son, le rat se positionne en position verticale (debout sur le mât), et présente des mouvements stéréotypés tels que des morsures du mât et des sauts contre les parois. Par ailleurs, ces réponses sont observées jusqu'à 6 mois après la fin du test (Lamproglou et al. 2009).

Lors de notre étude, les animaux soumis à cette version modifiée du test PCA présentent un nombre d'essais inférieur aux animaux des lots « sham », reflétant le caractère stressant de la situation pour l'animal. Par ailleurs cet état de stress est validé par différentes modifications des paramètres biologiques. Ainsi, le test PCA induit une perte de poids et une activation de l'axe HPA comme en témoigne l'augmentation des concentrations plasmatiques en corticostérone. Ces résultats ont précédemment été observés par d'autres auteurs (Dave et al. 2000; Bielajew et al. 2002; Feldker et al. 2006; Banasr et al. 2007; Marin et al. 2007). Cependant, certaines études ont montré que l'application d'un stress durant 14 jours (Kant et al. 2001) ou 21 jours (Wood et al. 2003) à des rats se traduit par une corticostéronémie identique chez les animaux stressés et non stressés. Les auteurs suggèrent que le contrôle de l'évènement stressant atténue les effets du stress sur la réponse physiologique (Kant et al. 2001; Wood et al. 2003). Dans notre étude, les animaux soumis au test PCA pendant 10 jours présentent des taux plasmatiques de corticostérone plus élevés que les animaux « sham ». Ce résultat suggère que, lors de l'application du test PCA, les rats ne contrôlent pas leur stress. Contrairement à l'équipe de Bernatova (Bernatova et al. 2003), nous n'observons aucun effet de la PB sur les taux de corticostérone, que les animaux soient stressés ou non.

Le test PCA appliqué pendant 10 jours, chez les rats, se traduit également par une augmentation des taux plasmatiques d'aldostérone. Peu d'études se sont intéressées aux effets du stress sur la sécrétion d'aldostérone. Pourtant, nos résultats corroborent certaines études démontrant que trois types de stress différents induisent chez des rats une hyperaldostéronémie plasmatique (Stier et al. 2004). Ces auteurs mettent par ailleurs en évidence qu'un stress d'immobilisation se traduit par une augmentation plus forte des taux d'aldostérone qu'un environnement froid ou qu'un stress de contention.

L'axe HPA est responsable du maintien de l'homéostasie suite à un stress. Sous l'effet d'un évènement stressant, l'hypothalamus est stimulé au niveau des noyaux PVN dont les neurones vont alors sécréter le CRF et l'AVP au niveau de l'éminence médiane. Ces deux hormones, *via* leur action au niveau de l'hypophyse antérieure, sont responsables de la sécrétion, par les cellules corticotropes, de POMC ensuite clivée en ACTH. L'ACTH alors libérée dans la circulation sanguine agit au niveau du cortex surrénalien à deux niveaux. Tout d'abord, au niveau des cellules de la zone fasciculée, cette hormone est responsable de la libération de glucocorticoïdes. L'ACTH agit également sur les cellules de la zone glomérulée du cortex surrénalien déclenchant la sécrétion d'aldostérone (Ulrich-Lai et al. 2006). L'hypothèse émise est que le test PCA provoque une augmentation de la sécrétion d'ACTH alors responsable de la libération de corticostérone et d'aldostérone par le cortex surrénalien. Le système rénine-angiotensine-aldostérone jouerait ainsi un rôle important dans la réponse de l'organisme suite à l'application pendant 10 jours du test PCA. Cette hypothèse corrobore celle proposée par d'autres auteurs pour différents types de stress (Aguilera et al. 1995; Stier et al. 2004).

Suite à l'application du test PCA pendant 10 jours, nos animaux présentent une perte de poids et une augmentation de la concentration plasmatique en corticostérone et en aldostérone lorsqu'ils sont comparés aux animaux « sham ». Ceci confirme que le test PCA modifié constitue bien un évènement stressant. Le traitement par la PB semble sans effet sur l'évolution de ces trois paramètres biologiques.

Afin de compléter les résultats obtenus concernant les variables biologiques, nous avons choisi de valider, d'un point de vue moléculaire, le test PCA comme un modèle de stress. Nous avons alors évalué l'expression d'Hsp70, de NF- $\kappa$ B et d'Il-1 $\alpha$  immédiatement après la dernière séance de PCA.

Les protéines Hsp70, initialement décrites lors d'un stress thermique (Ritossa 1962), sont induites par de nombreuses agressions telles qu'un stress chimique ou psychologique (Fukudo et al. 1997; Isosaki & Nakashima 1998; Kagawa & Mugiya 2002; Li et al. 2006). Elles sont, à ce titre, considérées comme des marqueurs de stress. Différents stimuli stressants peuvent conduire à une augmentation de la transcription d'Hsp70 au niveau du SNC. En effet chez le rat Wistar, une augmentation de la transcription d'Hsp70 est observée au niveau du cortex cérébral suite à un stress d'immersion (Fukudo

et al. 1997). Un stress de contention se traduit également par une augmentation des taux d'Hsp70 au niveau de la région CA3 de l'hippocampe (Li et al. 2006).

L'application, pendant 10 jours, du test PCA modifié se traduit par une augmentation de l'expression des ARNm codant pour Hsp70 au niveau des différentes structures cérébrales étudiées (hypothalamus, hippocampe, striatum et cortex frontal). Le traitement par la PB ne modifie pas significativement l'augmentation de l'activité transcriptionnelle d'Hsp70 induite par le test PCA.

L'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B a été évaluée par mesure de la transcription de son inhibiteur I- $\kappa$ B (Bottero et al. 2003). Nos résultats concernant l'expression d'I- $\kappa$ B nous permettent d'affirmer que le profil d'expression du gène NF- $\kappa$ B est similaire à celui observé pour Hsp70 et se traduit par une augmentation sous l'effet du stress. Différentes études ont en effet démontré que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est régulé par Hsp70 ; pourtant les mécanismes précis par lesquels cette modulation se produit restent indéterminés. Certains travaux, conduits *in vitro*, montrent qu'Hsp70 inhibe la voie d'activation de NF- $\kappa$ B (Chen et al. 2006). Par ailleurs, une étude récente a montré que des souris surexprimant Hsp70 présentent une inhibition de l'activation de NF- $\kappa$ B (Zheng et al. 2008). Inversement, d'autres études ont montré que la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B peut être activée par Hsp70 (Asea et al. 2002; Lee et al. 2005). Il semblerait que, de par sa fonction de molécule chaperon, Hsp70 interagisse avec les I- $\kappa$ B kinases (IKKs) en facilitant leur solubilisation et leur action. Les IKKs pourraient de ce fait phosphoryler I- $\kappa$ B, inhibiteur de NF- $\kappa$ B. Par ce mécanisme, Hsp70 agirait de façon positive sur la transcription de NF- $\kappa$ B (Lee et al. 2005). Nos résultats corroborent des études montrant qu'Hsp70 active la voie NF- $\kappa$ B que ce soit dans des monocytes humains (Asea et al. 2000; et al. 2005) ou dans le cervelet (Maroni et al. 2003).

Par ailleurs, il existe également une interaction entre I- $\kappa$ B et les glucocorticoïdes. Cependant les mécanismes d'activation d'I- $\kappa$ B par cette voie soulèvent une difficulté d'interprétation. En effet, l'induction d'I- $\kappa$ B est stimulée par les glucocorticoïdes (Scheinman et al. 1995; Heck et al. 1997) et par l'activation de la voie NF- $\kappa$ B puisque le promoteur du gène I- $\kappa$ B contient des sites de liaison NF- $\kappa$ B (Ito et al. 1994). Lors de nos expérimentations, l'application du test PCA modifié se traduit par une augmentation des concentrations plasmatiques en corticostérone. Cependant, notre étude ne révèle aucune corrélation entre les taux d'ARNm I- $\kappa$ B et les concentrations plasmatiques en corticostérone. Par ailleurs, il nous est difficile d'évaluer l'implication de NF- $\kappa$ B puisque son niveau d'activation n'est pas connu. L'application du test PCA se traduisant par une augmentation des taux de corticostérone et de l'activité transcriptionnelle d'Hsp70, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B pourrait être due à une action concomitante des glucocorticoïdes et d'Hsp70. Le traitement par la PB n'induit aucune modification significative de l'effet du PCA sur l'activité transcriptionnelle de NF- $\kappa$ B.

Différentes études ont montré une action du stress sur l'expression de la cytokine Il-1 au niveau du SNC. En effet, un stress social chronique de 21 jours appliqué à des souris se traduit par une diminution des quantités d'ARNm Il-1 $\beta$  au niveau de l'hippocampe (Bartolomucci et al. 2003). De même, un stress d'immobilisation induit une diminution de l'expression d'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus, de l'hippocampe et du striatum, 15 minutes après l'évènement stressant chez la Souris (Goujon et al. 1995).

L'hypothèse d'une régulation négative de la transcription par les glucocorticoïdes a alors été émise par les auteurs. De façon similaire, l'application du test PCA modifié pendant 10 jours se traduit par une inhibition significative de la transcription d'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus et par une augmentation des taux circulants de corticostérone. Les résultats de notre étude semblent donc en faveur d'une régulation négative des transcrits d'Il-1 $\alpha$  par l'augmentation plasmatique des glucocorticoïdes. Cette hypothèse est par ailleurs étayée par d'autres études montrant une action négative des glucocorticoïdes sur la transcription de l'Il-1 au niveau des cellules immunitaires (Knudsen et al. 1987; Lew et al. 1988; Amano et al. 1993) ainsi qu'au niveau de différentes structures cérébrales (Gemma et al. 2003).

*L'application du test PCA modifié pendant 10 jours induit une perte de poids, une activation de l'axe HPA traduite par une hypercorticostéronémie et une hyperaldostéronémie. Par ailleurs, au niveau moléculaire, ce test provoque une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'Hsp70, de NF- $\kappa$ B et une diminution de l'expression d'Il-1 $\alpha$ , trois gènes dont l'expression est modulée par le stress. Au vu de ces données, nous sommes en mesure d'affirmer que les modifications apportées au test PCA, à l'origine employé comme test d'apprentissage, induisent bien un stimulus stressant. Le traitement par la PB à la dose de 1,5 mg/kg/j per os, ainsi que l'application du test PCA pendant 10 jours constituent donc un bon modèle pour mimer, chez le Rat, certaines des conditions vécues par les soldats pendant le conflit du Golfe.*

## **2) Effets du modèle sur la réaction cellulaire et les facteurs de transcription c-Fos et c-Jun**

Au niveau de l'hypothalamus comme de l'hippocampe, le test PCA se traduit par une augmentation de la transcription des deux gènes c-Fos et c-Jun. Ces deux gènes font partie d'un groupe de gènes nommés « immediate early genes » (IEGs) qui présentent une activation rapide et transitoire. Ils représentent ainsi les marqueurs de référence d'une activation cellulaire.

L'expression constitutive des ARNm et des protéines c-Fos dans le cerveau de Rat est très faible (Cullinan et al. 1995; Hughes & Dragunow 1995; Herrera & Robertson 1996). Au contraire, les ARNm et la protéine c-Jun sont présents à des niveaux élevés dans l'hippocampe et le cortex de rat

(Cullinan et al. 1995; Hughes & Dragunow 1995; Herrera & Robertson 1996). Par ailleurs, lors d'une exposition au stress, il semble que les profils d'expression de c-Fos et c-Jun soient très proches (Cullinan et al. 1995).

Lors de notre étude, les animaux « sham » présentent des quantités d'ARNm de c-Fos et de c-Jun détectables dans l'hypothalamus et dans l'hippocampe, renforçant l'hypothèse d'une présence constitutive de ces ARNm (Cullinan et al. 1995; Herrera & Robertson 1996). Comme attendu, au niveau de l'hippocampe, c-Jun présente une expression constitutive plus élevée que celle de c-Fos.

L'application du test PCA pendant 10 jours se traduit par une augmentation de l'expression de ces deux gènes au niveau de l'hypothalamus comme de l'hippocampe. Ces résultats corroborent plusieurs études précédemment conduites. Il a en effet été montré que des souris soumises à un choc électrique présentent une augmentation de l'expression de c-Fos et c-Jun au niveau de l'hippocampe et des noyaux PVN et SON de l'hypothalamus (Wu et al. 2006). De même, un stress de contention de deux heures conduit à une augmentation de l'expression de ces deux gènes au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Autelitano 1998). Selon Troakes et al., l'augmentation de l'expression de ces deux gènes serait liée au développement du caractère anxieux des animaux (Troakes & Ingram 2008). Dans leur étude, des rats nouveaux-nés sont soumis à un stress psychologique par privation du contact avec leur mère 6 heures par jour de J5 à J21 après la naissance. A J70, les animaux sont soumis à un test de labyrinthe surélevé. Ce test révèle que les animaux privés de leur mère présentent plus de signes d'anxiété que leurs congénères non stressés. Par ailleurs, les auteurs mettent en évidence que ces mêmes animaux présentent une augmentation de l'expression de c-Fos au niveau du cortex cingulaire, de l'amygdale et de l'hippocampe (Troakes & Ingram 2008). Ils émettent alors l'hypothèse d'un lien entre l'augmentation de l'expression des IEGs et le développement de l'anxiété.

Au contraire, d'autres données de la bibliographie mettent en évidence une inhibition de l'expression de c-Fos et c-Jun consécutive à une élévation des taux de corticostérone. Ainsi, un stress d'immobilisation de deux heures par jour pendant 6 jours se traduit, chez le Rat, par une atténuation de l'expression de ces deux gènes au niveau du noyau PVN de l'hypothalamus, immédiatement après la dernière séance de stress (Umemoto et al. 1997). Lors de notre étude, l'application du test PCA se traduit par deux effets concomitants : l'activation de l'axe HPA et l'activation cellulaire avec production d'IEGs. Chez nos animaux stressés, l'hypercorticostéronémie n'inhibe donc pas l'augmentation de la transcription de c-Fos et de c-Jun au niveau de l'hypothalamus ni de l'hippocampe. Lors de notre étude, l'expression de ces deux gènes a été évaluée immédiatement après la dernière séance de stress. Une étude de la cinétique d'activité transcriptionnelle de ces deux gènes serait intéressante afin d'évaluer s'il existe une différence d'augmentation de leur transcription entre le premier et le dernier jour d'application du PCA. Par ailleurs, l'expression des ARNm de ces deux gènes n'est pas modifiée par le traitement par la PB au niveau des deux structures étudiées. Il serait

intéressant de compléter nos résultats en mesurant l'expression de ces gènes, en terme de messenger et de protéine, dans d'autres structures. En effet, Taysse et al. observent une activation de c-Fos au niveau de l'hippocampe, du thalamus et du cortex pyriforme lorsque le stress est associé à la PB (Taysse et al. 2005).

Afin de compléter les informations sur le stress cellulaire données par l'expression des ARNm Hsp 70, nous nous sommes intéressés à la détermination de l'expression d'un marqueur de l'activation calcique MCIP1 (« Myocyte-calcineurin-interacting protein » ou « modulatory-calcineurin-interacting protein »). L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire stimule de nombreux processus métaboliques *via* des protéines de liaison au  $Ca^{2+}$  (*i.e.* MCIP1). Identifiée à l'origine dans les muscles squelettiques et cardiaques, MCIP1 possède une activité biologique plus large (Rothermel et al. 2003) puisque cette protéine est également présente au niveau des neurones (Ermak et al. 2001). L'ARNm MCIP1 est induit en moins de 90 minutes et présente une expression maximale 5 heures après l'augmentation de l'oxydation cellulaire et de  $Ca^{2+}$  (Crawford et al. 1997) *via* des mécanismes impliquant la calcineurine (Rothermel et al. 2003). L'expression des ARNm MCIP1 représente donc un marqueur du stress oxydant et de l'activation de la calcineurine. Lors de notre étude, la réactivité cérébrale au stress est mise en évidence par l'augmentation d'expression des ARNm d'Hsp70 dans les différentes structures cérébrales. Par contre, dans les quatre structures cérébrales étudiées, l'absence d'effet du stress, du traitement comme de leur association sur l'expression des ARNm de MCIP1 est en défaveur de l'implication de la calcineurine ou du stress oxydant dans ce modèle de stress, au délai observé.

*Au vu de ces données, le stimulus stressant induit par le test PCA modifié entraîne une réactivité cérébrale se traduisant par une augmentation de l'expression des deux IEGs c-Fos et c-Jun. L'application du test PCA pendant 10 jours n'induit aucune modification de l'expression de MCIP1. Il est à noter que dans ce modèle et pour les gènes étudiés, le traitement par la PB ne modifie pas les effets géniques induits par le test PCA (J12). Par ailleurs, même si une réactivité cérébrale est détectée au dernier jour du stress et du traitement, les résultats de notre étude histologique ne révèlent aucune atteinte neuropathologique 10 jours après arrêt du stress et du traitement (J22).*

### **3) Conséquences comportementales du modèle**

#### **3.1 - Effets du stress**

Après une courte période (2 minutes) de rappel de la situation stressante (sans application du choc électrique), les rats stressés soumis au test du labyrinthe aquatique présentent des capacités identiques aux animaux « sham ». Le stress induit par le test PCA ne semble donc pas modifier les capacités d'apprentissage de nos animaux. Nos résultats corroborent l'hypothèse émise par l'équipe suisse de Sandi selon laquelle les changements morphologiques consécutifs à un stress peuvent varier selon le

type de stress appliqué (social, immobilisation, psychologique, ou imprédictible) et sa durée (Sandi et al. 2001; Touyarot & Sandi 2002; Venero et al. 2004) et ainsi conduire à des réponses comportementales variées.

De nombreux travaux ont étudié les effets d'un évènement stressant sur les processus d'apprentissage et de mémorisation. Certains travaux ont montré que l'application d'un stress chronique se traduit par des défauts des processus d'apprentissage (Ohl & Fuchs 1999; Zhang et al. 2003; Touyarot et al. 2004; Sandi et al. 2005) alors que d'autres démontrent une augmentation des facultés mnésiques suite à un stress (Luine et al. 1996; Bartolomucci et al. 2002; Bowman et al. 2003; Sun et al. 2006; Li et al. 2007). Ces effets du stress, en apparence contradictoires, semblent impliquer les glucocorticoïdes (Conrad et al. 1999; Kim & Diamond 2002) et dépendre du caractère « chronique » ou non du stress.

Ainsi un stress de contention de 6 heures par jour pendant 10 jours induit, chez des rats mâles Sprague-Dawley, une augmentation des capacités d'apprentissage dans un labyrinthe, 3 jours après la fin de l'évènement stressant. Par contre, aucun effet sur les capacités mnésiques n'est observé lorsque les animaux sont soumis à 7 jours de stress (Luine et al. 1996). De la même façon, des rats Wistar soumis à un stress multiple pendant 6 semaines présentent une augmentation des capacités d'apprentissage dans un labyrinthe aquatique (Sun et al. 2006; Li et al. 2007). De même un stress psychologique de 5 semaines induit, chez des musaraignes, de meilleures capacités d'apprentissage dans un labyrinthe (Bartolomucci et al. 2002). Par ailleurs, l'effet du stress sur les capacités d'apprentissage dépend du sexe de l'animal. Un stress de contention de 6 heures par jour pendant 21 jours se traduit par une augmentation des capacités d'apprentissage dans un labyrinthe à 8 branches chez les femelles (Bowman et al. 2001) et une diminution de ces mêmes capacités chez les mâles (Bowman et al. 2003). L'hypothèse émise par les auteurs est une modulation des capacités mnésiques par les concentrations en oestrogènes. En effet, les oestrogènes augmentent les capacités d'apprentissage et de mémorisation chez l'Homme comme chez les animaux (pour revue, Luine 1997).

D'autres études ont, par contre, mis en évidence une diminution des capacités d'apprentissage consécutives à un stress. Ainsi des souris exposées à un prédateur 2 heures par jour pendant 2 semaines présentent des difficultés d'apprentissage lorsqu'elles sont soumises à un test de labyrinthe 7 jours après la dernière exposition au prédateur (Schwabe et al. 2008). De même un stress social tel que l'exposition de 30 minutes à un prédateur (Sandi et al. 2005) ou la cohabitation avec un animal plus âgé 8 heures par jour pendant 21 jours (Touyarot et al. 2004), induit chez des rats une diminution des capacités d'apprentissage dans un labyrinthe. Dans ces deux études, les auteurs mettent en évidence une diminution de l'expression de NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) au niveau de l'hippocampe et du cortex frontal sans affecter l'expression de cette molécule au niveau de l'amygdale et du cervelet (Sandi et al. 2005). Cette diminution de l'expression de NCAM suite à un stress

chronique de contention a été observée au niveau moléculaire (Venero et al. 2004) comme au niveau protéique (Sandi et al. 2001; Touyarot & Sandi 2002).

Même si un stress répété est particulièrement connu pour altérer les processus d'apprentissage et de mémorisation mais également les réponses émotionnelles (McEwen 1998; McEwen 2000), il est également responsable de la modulation des comportements agressifs. Ainsi il a été observé que des rats soumis à un stress chronique d'immobilisation ou de contention présentent un comportement plus agressif (Wood et al. 2008). Les résultats d'études conduites au laboratoire en utilisant notre modèle mettent en évidence une augmentation de l'agressivité des rats stressés vis-à-vis de leurs congénères, après application du test PCA. Lors de ces mêmes travaux, notre équipe a également montré que le traitement par la PB, administré 30 minutes avant la séance de stress, prolonge cette agressivité induite par le stress jusqu'à 6 mois après l'arrêt du stress et du traitement et induit des défauts des processus mnésiques pour ce même délai. Ces observations peuvent être comparées aux symptômes persistants décrits par certains vétérans de la guerre du Golfe (Lamproglou et al. 2009). Ainsi, il semble que même si notre modèle de stress présente peu d'effets sur les capacités d'apprentissage, il induit une altération du comportement social, chez le Rat.

### **3.2 - Effets du traitement par la PB**

Les résultats obtenus lors de notre étude ne mettent en évidence aucun effet du traitement par la PB sur l'impulsivité des animaux « sham » lors du test PCA (sans application du choc électrique), ni sur leur capacité d'apprentissage dans le test du labyrinthe aquatique. A notre connaissance, peu d'études se sont intéressées aux effets d'un traitement répété par la pyridostigmine sur le comportement des animaux, en particulier sur les capacités d'apprentissage. Chez des rats Sprague-Dawley, l'administration de PB (80 mg/l diluée dans l'eau de boisson) pendant 3 semaines n'induit aucun défaut cognitif ni aucun trouble de l'activité locomotrice lors de tests comportementaux (Scremin et al. 2003). Par contre, d'autres auteurs ont mis en évidence une augmentation de l'activité locomotrice des rats suite à un stimulus auditif après un traitement de 7 jours par la PB (0,045 mg/l, diluée dans l'eau de boisson) (Servatius et al. 2000). Enfin, le test PCA appliqué lors d'une précédente expérimentation conduite au laboratoire ne montre aucun effet du traitement par la PB sur l'agressivité des animaux lors d'un test de bataille électrique (Lamproglou et al. 2009).

### **3.3 - Effets de l'association du stress et du traitement par la PB**

Différents travaux ont été conduits dans le but d'évaluer les effets consécutifs à la prise de PB en condition de stress. Les résultats de ces études sont souvent contradictoires mais la plupart concluent que le stress ne favorise pas le passage de la PB au niveau cérébral. Ces différences de résultats peuvent s'expliquer par le fait que plusieurs facteurs jouent un rôle dans les effets du stress sur le

SNC, et en particulier le type de stress, son intensité, sa chronicité ainsi que le sexe et l'âge des animaux.

L'équipe de Friedman a été la première à observer et à décrire des effets combinés d'un traitement par la PB et du stress au niveau cérébral (Friedman et al. 1996). De nombreuses autres études ont suivi afin de tenter de reproduire cet effet et de vérifier sa dépendance à un stress ou à un traitement donné. Ainsi, l'association du stress et du traitement par la PB se traduit, chez le Rat, par une inhibition de l'activité AChE au niveau du cervelet, de l'hippocampe (Tian et al. 2002) et du striatum (Beck et al. 2003). Une étude conduite récemment a montré que l'administration chronique de PB (10 mg/kg/jour, minipompes implantées) pendant 7 jours à des souris mâles, se traduit par une inhibition de l'activité cholinestérasique au niveau de l'hypothalamus (Ropp et al. 2008). Par ailleurs, l'association du stress et du traitement induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'AChE au niveau de l'hypothalamus et du cortex (Ropp et al. 2008). Par contre, lors de nos expérimentations, l'association du traitement par la PB (1,5 mg/kg, *p.o.*) et du test PCA ne modifie pas l'activité transcriptionnelle de l'AChE au niveau des différentes structures cérébrales étudiées. Il est cependant à noter que la dose de PB administrée à des souris lors de l'étude de Ropp (Ropp et al. 2008) est élevée et induit une inhibition de l'activité AChE sanguine de l'ordre de 75% comparée à 40% dans notre étude. La forte dose de PB administrée à des souris pourrait expliquer l'inhibition de la transcription de l'AChE observée par ces auteurs au niveau de l'hypothalamus. Par ailleurs, cette structure contenant des organes circumventriculaires est une zone dépourvue de BHE. Un effet de la PB au niveau de l'hypothalamus est donc envisageable par entrée de la PB dans le SNC à ce niveau. Lors de nos expérimentations, l'activité AChE cérébrale n'a pas été mesurée au niveau de l'hypothalamus. Par contre, les immunomarquages anti-AChE réalisés à J22 (10 jours après l'arrêt du stress et du traitement) ne mettent en évidence aucune modification de la quantité de protéine « AChE » quelle que soit la structure observée, y compris l'hypothalamus. Il serait intéressant de compléter nos résultats par la détermination de l'activité enzymatique au niveau de cette structure. Cependant, de par l'absence de BHE à ce niveau, il serait difficile d'attribuer l'éventuelle inhibition de l'activité AChE au traitement par la PB seule ou à son association avec le stress.

*A contrario*, plusieurs travaux n'ont révélé aucun effet central de la PB lorsque le traitement est administré en situation de stress (Lallement 1998; Telang et al. 1999; Grauer et al. 2000; Song et al. 2002; Park et al. 2008). Certains auteurs émettent l'hypothèse que les effets centraux de la PB observés dans des conditions de stress par l'équipe de Friedman seraient dus à une perfusion insuffisante des cerveaux de rat lors du prélèvement, comme le suggèrent les travaux de Ovadia et al. (Ovadia et al. 2001). En effet, la non perfusion du tissu cérébral peut conduire à estimer, de façon erronée, une inhibition de 8 à 12% de l'activité AChE en raison de la persistance du sang au niveau du

SNC. Toutefois il est à noter que Friedman et al. ont confirmé l'ouverture de la BHE par passage de bleu evans (Friedman et al. 1996).

Au vu de ces données bibliographiques, les effets de la pyridostigmine administrée en situation de stress ne sont pas encore bien établis. Certaines études ont montré des conséquences de l'association du stress et du traitement au niveau du SNC. D'autres auteurs n'ont pu reproduire les résultats de Friedman (Friedman et al. 1996) en réalisant le même protocole ou en faisant varier différents paramètres tels que l'espèce animale, le type de stress et la voie d'administration. Les résultats de nos expérimentations corroborent les résultats de ces différentes équipes puisque nous avons été dans l'incapacité de mettre en évidence, de façon indirecte, l'entrée de PB au niveau du SNC suite au stress induit par le PCA. En effet, à J12 immédiatement après la fin du stress, aucune inhibition de l'activité ChE comme AChE n'a été détectée ni au niveau de l'hippocampe, ni du striatum, ni du cortex frontal. Une expérimentation conduite au laboratoire et utilisant de la PB tritiée ne met pas non plus en évidence, à J12, de passage du traceur au niveau cérébral (résultats non publiés). De même, nous n'avons observé aucune inhibition de l'activité AChE cérébrale chez des souris traitées et soumises à un stress de contention pendant 6 heures (résultats non publiés). Un éventuel passage de la PB au niveau du SNC lors des premiers jours d'application du test PCA reste une hypothèse envisageable. Aussi une cinétique de l'activité ChE cérébrale, établie après chaque séance de PCA, serait intéressante mais difficile à mettre en œuvre puisque ce protocole nécessiterait le sacrifice d'un grand nombre d'animaux.

Même si les conséquences de l'association du stress et du traitement par la PB sur l'activité AChE cérébrale restent controversées, cette association peut se traduire par des effets au niveau du SNC. En effet, les résultats de notre étude montrent des troubles des capacités d'apprentissage lors du test de labyrinthe aquatique. Par ailleurs, des travaux antérieurs conduits au laboratoire montrent les conséquences de l'association du stress et du traitement lors d'un test d'agressivité (Lamproglou et al. 2009). Enfin, la combinaison de ces deux facteurs induit une activation du système dopaminergique central (Taysse et al. 2005). Afin d'expliquer les éventuelles conséquences d'un traitement par la PB au niveau du SNC des animaux stressés, quatre hypothèses peuvent être émises impliquant des effets directs ou indirects par la mise en jeu de mécanismes périphériques :

- la première hypothèse fait intervenir une altération de la perméabilité de la BHE consécutive à un stress. De cette façon, le stress associé à la prise de PB favoriserait l'entrée de la PB ou d'un de ses métabolites au niveau du cerveau. Du fait de leur polarité, la PB et ses métabolites ne peuvent pénétrer au niveau du SNC dans des conditions normales (Birtley et al. 1966; Somani et al. 1972; Barber et al. 1979). Cependant, différentes conditions stressantes peuvent induire des défauts de la perméabilité de la BHE (Belova & Jonsson 1982; Ben Nathan et al. 1991; Sharma et al. 1992; Diserbo et al. 2002)

favorisant le passage de différentes molécules ou neurotransmetteurs ou virus au niveau cérébral alors qu'ils en sont exclus dans des conditions normales.

Cette hypothèse est étayée par Beck et son équipe démontrant une diminution de l'activité AChE cérébrale consécutive à l'administration périphérique d'un anticholinestérasique dans des conditions de stress (Beck et al. 2003). Cette hypothèse ne peut cependant expliquer les résultats obtenus lors de notre étude. En effet immédiatement après la séance de PCA, *i.e.* la séance de stress répété, nous n'avons pu observer, chez les rats traités par la PB, ni inhibition de l'activité ChE cérébrale ni passage de PB tritiée (résultats non publiés). Par ailleurs à notre connaissance, aucune étude n'a pu à ce jour détecter la PB au niveau du SNC chez des animaux stressés (Lallement 1998; Telang et al. 1999; Beck et al. 2001; Kant et al. 2001; Tian et al. 2002). Seuls Miller et Verma en utilisant l'HPLC couplée à un dosage radioimmunologique ont détecté de faibles quantités de PB au niveau du cerveau entier d'animaux non stressés (Miller & Verma 1989). Cependant lors de cette étude, une forte quantité de PB (1 mg/kg, *i.m.*) a été administrée aux animaux, dose représentant 10 fois celle que nous avons utilisée.

- dans la deuxième hypothèse, la PB pourrait pénétrer dans le SNC au niveau de différentes structures dépourvues de BHE, tels que les organes circumventriculaires au niveau de l'hypothalamus, l'éminence médiane et le lobe postérieur de l'hypophyse. Cependant dans cette hypothèse, la PB induirait des troubles comportementaux même chez les animaux non-stressés. Cette hypothèse serait donc réfutée par les résultats observés lors de notre étude.

Si l'une de ces deux hypothèses était vérifiée, elle pourrait expliquer certains troubles cognitifs à long terme décrits par les vétérans. En effet, il est bien admis que le système cholinergique central est fortement impliqué dans la régulation des fonctions cognitives.

- La troisième hypothèse a été suggérée par Abou-Donia (Abou-Donia et al. 1996) et Grauer (Grauer et al. 2000) et fait intervenir une action de la PB sur l'activité estérase des cellules endothéliales de certains capillaires cérébraux. La PB, en agissant sur ces cellules endothéliales, entraînerait une altération de la perméabilité de la BHE permettant l'entrée de xénobiotiques et de substrats physiologiques au niveau du SNC. Ainsi, il a été montré que la PB atténue les effets du paraoxon sur la BHE (Song et al. 2004).

- Enfin Taysse et son équipe observent que la réponse du système sérotoninergique au stress est exacerbée par la PB et suggèrent que la PB puisse induire des effets au niveau du SNC via des mécanismes indirects grâce à son action au niveau périphérique (Taysse et al. 2005). En effet, au niveau du SNP, la PB peut agir au niveau de nombreuses synapses cholinergiques dont beaucoup sont impliquées dans la réponse au stress (Taysse et al. 2005). Certaines fibres pré-ganglionnaires splanchniques ont des terminaisons au niveau de la glande médullo-surrénale à partir desquelles

l'AChE est sécrétée (Somogyi et al. 1975). Par ailleurs, le nerf vague possède des afférences et des efférences dont la stimulation modifie les processus cognitifs, probablement en agissant sur l'activité des structures du SNC (Hassert et al. 2004).

*Notre modèle de stress associé au traitement par la PB n'induit aucun effet au niveau de l'activité cholinérasique cérébrale. Par ailleurs, nous n'observons aucune conséquence histologique ni moléculaire 10 jours après la fin du stress et du traitement. Comment alors expliquer les conséquences comportementales observées lors du test du labyrinthe aquatique chez les animaux traités par la PB avant la séance de PCA ?*

#### **4) Effets du modèle sur l'expression génique à J12**

Lors de cette étude, nous nous sommes attachés à l'étude de l'expression des gènes au niveau de deux structures cérébrales : l'hypothalamus, impliqué dans la réponse au stress via l'axe HPA (Tsigos & Chrousos 2002; de Kloet 2008) et l'hippocampe, structure sensible au stress et fortement impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Kesner 2007; Kubik et al. 2007).

##### **4.1- Effets du stress : modulation de l'expression d'Il-1 $\alpha$**

La voie de signalisation de la cytokine Il-1 est impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation. En effet, des rats traités par une injection intracérébrale de l'antagoniste Il-1ra présentent des défauts d'apprentissage dans un test de labyrinthe aquatique (Yirmiya et al. 2002). De même, des souris traitées par l'Il-1ra (20 mg/kg/jour) *in utero* pendant 4 jours présentent une absence d'apprentissage dans un test de labyrinthe aquatique à l'âge adulte (Goshen et al. 2007). Les auteurs mettent ainsi en évidence l'importance de la signalisation de la cytokine Il-1 pendant le développement cérébral *in utero*. Par ailleurs la délétion du récepteur Il-1R1 (Goshen et al. 2000; Goshen et al. 2001; Avital et al. 2003) chez des animaux KO affecte la voie de signalisation de l'Il-1 et induit des défauts des capacités d'apprentissage dans un test de labyrinthe aquatique. De même, l'administration à des doses élevées de la cytokine (Oitzl et al. 1993; Gibertini et al. 1995) diminue également les capacités d'apprentissage lors d'un test de labyrinthe aquatique. Pourtant il a été montré que l'Il-1 $\alpha$  endogène module l'apprentissage chez des rats (Depino et al. 2004).

D'autres études ont montré que l'administration de cette cytokine (à des taux pathologiques) à des nouveau-nés se traduit par des défauts des capacités mnésiques à l'âge adulte (Tohmi et al. 2004; Tohmi et al. 2007). Ainsi, comme suggéré par une équipe israélienne, l'idée d'une double action de l'Il-1 a émergé : des taux physiologiques de la cytokine sont nécessaires pour les processus d'apprentissage et de mémorisation alors qu'une diminution ou un excès d'Il-1 se traduit par des défauts de l'apprentissage (Goshen et al. 2007; Goshen & Yirmiya 2008) (cf figure 19, page 66).

Comme suggéré précédemment, les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans l'apprentissage et la mémorisation des animaux. Les auteurs mettent en évidence que les effets des glucocorticoïdes peuvent être inhibiteurs (particulièrement à de hauts niveaux) ou facilitateurs (à de faibles niveaux) (McEwen et al. 1995; de Kloet et al. 1999; Kim & Diamond 2002; de Kloet et al. 2005). Ainsi comme l'implication de l'Il-1 sur les capacités d'apprentissage, les glucocorticoïdes exerceraient également une influence en « cloche » sur les processus de mémorisation (Diamond et al. 1992; Conrad et al. 1999; Goshen & Yirmiya 2008).

Lors de nos expérimentations, l'application du test PCA modifié se traduit, au niveau de l'hypothalamus, par une baisse de l'expression d'Il-1 $\alpha$ . Ainsi, comme suggéré par Goshen (Goshen et al. 2007), il semble que notre modèle de stress pourrait modifier les capacités d'apprentissage des animaux. Pourtant les résultats dans le labyrinthe aquatique révèlent que les animaux soumis au test PCA apprennent aussi vite que les animaux « contrôle » du groupe « sham-eau ». Alors que différentes études ont démontré l'importance de cette cytokine pour les processus cognitifs, les capacités d'apprentissage de nos animaux stressés ne semblent ni altérées ni augmentées. Différentes hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ce phénomène :

- lors de notre étude, le test PCA a été réalisé pendant 10 jours. Il est possible que cette durée soit trop courte pour observer un effet du stress sur l'apprentissage des animaux. En effet la plupart des travaux mettant en évidence des effets du stress sur les capacités mnésiques utilisent un stress chronique appliqué pendant plus de 3 semaines ;
- par ailleurs, même si l'application du PCA se traduit par une diminution de la transcription de l'Il-1 $\alpha$ , il est possible que cette inhibition soit insuffisante pour induire des troubles des processus d'apprentissage. En effet, dans la majorité des études, la diminution de l'expression de l'Il-1 fait suite à un blocage de sa signalisation par utilisation d'animaux KO pour le récepteur Il-1R1 (Goshen et al. 2000; Goshen et al. 2001) ou par administration de l'antagoniste Il-1ra (Yirmiya et al. 2002; Goshen et al. 2007). Dans notre étude, les animaux soumis au test PCA présentent une diminution de l'expression de la cytokine mais l'ARNm codant pour l'Il-1 $\alpha$  reste tout de même détectable ;
- le test du labyrinthe aquatique a été réalisé à J15 soit trois jours après la fin du stress. Comme spécifié précédemment, il existe un lien étroit entre les taux de glucocorticoïdes et les taux d'Il-1. L'hypothèse émise tient à la « récupération » des animaux pendant ce délai. Cependant, celle-ci semble peu envisageable car même si les animaux n'ont pas été soumis au test PCA pendant 3 jours, la séance de labyrinthe aquatique est précédée d'un rappel des conditions stressantes pendant 2 minutes dans l'enceinte servant pour le PCA mais sans application du choc électrique.

Des études complémentaires seraient nécessaires afin de tenter d'identifier les mécanismes par lesquels l'application du test PCA induit une diminution de l'expression de l'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus. Il semble que le système sérotoninergique puisse être impliqué puisque différents travaux ont montré un lien entre la cytokine et cette voie. En effet, l'injection du précurseur de la sérotonine, le 5-HTP, à des rats se traduit par une diminution de l'expression de la cytokine au niveau de l'hypothalamus et de l'hippocampe (Gemma et al. 2003). Par ailleurs, l'administration *i.p.* d'Il-1 $\alpha$  à des rats Sprague-Dawley augmente les concentrations de sérotonine au niveau de l'hypothalamus (Shintani et al. 1993; Shintani et al. 1995; O'Connor et al. 2000). Enfin il semble que le système sérotoninergique soit impliqué dans des modifications comportementales suite à un stress psychologique (Inoue et al. 1994; Sajdy et al. 1997).

#### **4.2- Effets du traitement par la PB : modulation de l'expression des MR**

Les animaux traités par la PB ne présentent aucun défaut des capacités d'apprentissage. Alors que le traitement par la PB pendant 10 jours ne modifie pas la transcription d'Il-1 $\alpha$  au niveau de l'hypothalamus, il se traduit par une augmentation de la transcription de la cytokine au niveau de l'hippocampe, alors même que la corticostéronémie n'est pas influencée par le traitement. A notre connaissance aucune étude n'a démontré un effet de la PB administrée en périphérie sur la régulation de la cytokine cérébrale. Ainsi l'action du pré-traitement sur l'expression d'Il-1 $\alpha$  reste inexplicée.

Les résultats de notre analyse moléculaire à J12, immédiatement après la dernière séance de stress et de traitement, révèlent que la PB induit une augmentation de l'expression des récepteurs aux minéralocorticoïdes (MR) au niveau de l'hypothalamus chez les animaux stressés comme non stressés sans affecter l'expression des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR). Différentes hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ce phénomène.

La PB entraînant une modulation de l'expression des MR, récepteurs aux minéralocorticoïdes, notre première hypothèse impliquait la sécrétion d'aldostérone. Nous avons envisagé que la PB puisse induire une augmentation de la sécrétion de cette hormone. Une boucle de contrôle serait dans ce cas responsable d'une augmentation de l'expression des MR permettant de compenser l'augmentation de la sécrétion d'aldostérone. Cependant au niveau du SNC, les récepteurs aux glucocorticoïdes sont soumis à une boucle de régulation négative. Il a en effet été montré que l'augmentation de la liaison de leur ligand induit une inhibition de la transcription de leur propre ARNm (Herman et al. 1989; Hansson et al. 2000). Par ailleurs, nos résultats ne montrent aucun effet significatif du traitement par la PB sur les concentrations plasmatiques d'aldostérone que ce soit chez les animaux stressés comme non stressés. Enfin, à notre connaissance, aucune étude n'a montré que la liaison de l'aldostérone sur son récepteur induit une augmentation de la transcription des MR. De plus, le promoteur du gène codant pour les MR ne possède aucun site de liaison pour les MR liés à l'aldostérone. En revanche, il possède

un site de fixation pour les GR (de Kloet et al. 2005) nous conduisant à envisager une seconde hypothèse faisant intervenir la réponse au stress.

En effet, les deux types de récepteurs aux glucocorticoïdes (MR et GR) sont impliqués dans la réponse au stress via l'axe HPA (Spencer et al. 1998). Les GR présentent une faible affinité pour la corticostérone et sont, de ce fait, seulement impliqués lors d'un stress. Les MR présentent une affinité 10 fois plus élevée pour la corticostérone et sont saturés même dans des conditions basales (de Kloet et al. 2005). Ainsi la principale fonction assurée par les GR serait de « normaliser » l'activité cérébrale quelques heures après un stimulus stressant (Joels et al. 2007). Depuis quelques années, le concept d'une « balance » entre ces deux récepteurs a émergé. Suite à un événement stressant, cette balance est responsable du maintien de l'homéostasie. Ainsi, toute modification de cette balance MR/GR induit, pour les individus, une perte de la faculté à conserver l'homéostasie de l'organisme (de Kloet et al. 1998; de Kloet et al. 2005; de Kloet 2008). Les deux types de récepteurs présentent une action différentielle lors de la réponse au stress : au niveau de l'hippocampe, les MR contrôlent la réaction dite de « stress initial » alors que les GR sont essentiels lors de la phase d'adaptation (De Kloet et al. 1998; Joels et al. 2007; Joels et al. 2008). Par ailleurs, les GR sont indispensables à la réponse au stress. En effet, chez le Rat, on observe une plus faible augmentation des taux de corticostérone plasmatique consécutive à une heure de stress de choc électrique intermittent lorsque les animaux ont été traités par un antagoniste des GR (RU-38486) (Moldow et al. 2005). Les animaux traités par un antagoniste des MR (RU-28318) et stressés présentent des taux de corticostérone similaire à des rats stressés n'ayant pas reçu l'antagoniste.

Chez le Rat, la transcription des ARNm des deux types de récepteur reflète leur expression protéique (Sanchez et al. 2000). Au vu de nos résultats, il semble que la PB, en augmentant l'expression des MR donc leur transcription, puisse modifier la balance MR/GR induisant de ce fait un plus faible recrutement des récepteurs GR lors d'un événement stressant. En effet, selon le principe de cette balance, une augmentation du nombre de MR par rapport aux GR pourrait être en faveur d'une diminution de la réponse de l'axe HPA à un événement stressant. Cette hypothèse est étayée par une étude comparative réalisée entre des rats Lewis et Wistar. En réponse à un stimulus stressant, les rats Lewis présentent de plus faibles taux plasmatiques d'ACTH et de corticostérone que les autres souches de la même espèce. Ils sont donc caractérisés par une moindre réponse au stress. Par ailleurs ces mêmes animaux présentent des taux plus élevés de MR (Oitzl et al. 1995). Ainsi le traitement quotidien par la PB à la dose de 1,5 mg/kg/j pendant 10 jours se traduirait, chez le rat Wistar adulte, par une modification de la réponse au stress des animaux. Les animaux traités présentent, en effet, une expression des récepteurs MR qui pourrait diminuer leur réponse au stress.

#### **4.3- Effets de l'association du stress et de la PB : modulation de l'expression de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$**

Notre étude comportementale révèle que les animaux stressés et ayant reçu la PB présentent un temps de parcours plus long que les animaux des autres lots lors du test du labyrinthe aquatique. Il semble donc que l'association du stress et du traitement induise des défauts des capacités d'apprentissage. Pourtant les animaux continuent à apprendre puisque leur temps de parcours diminue de jour en jour. Même si le stress seul ne présente aucun effet sur l'expression de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$ , la transcription de ces trois gènes est augmentée au niveau de l'hippocampe des animaux traités par la PB puis soumis au test PCA. Cette augmentation de l'activité transcriptionnelle pourrait être corrélée aux troubles observés chez ces animaux lors du test du labyrinthe aquatique. Comme nous l'avons développé dans la partie bibliographique de ce manuscrit, plusieurs études ont en effet montré l'importance de ces trois molécules pour les processus d'apprentissage et de mémorisation (Silva et al. 1992; Blanquet & Lamour 1997; Cho et al. 1998; Mu et al. 1999; Yamada & Nabeshima 2003; de Quervain & Papassotiropoulos 2006; Sun et al. 2006; Hashimoto et al. 2008). Par ailleurs, l'hippocampe est une structure particulièrement sensible au stress (McEwen 1998) et joue un rôle important dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Morris et al. 1982; Moser et al. 1993; Sousa et al. 2000). D'autres études ont précédemment montré qu'un changement de la régulation de certains gènes au niveau de l'hippocampe, chez le Rat, est associé à des modifications des capacités d'apprentissage (Liu et al. 2004; Sun et al. 2006).

Ainsi, des rats soumis à un stress chronique multiple (contention, éclairage en période nocturne) pendant 6 semaines apprennent plus vite dans un labyrinthe aquatique et présentent une augmentation de l'expression des ARNm codant pour CamKII, CaM et CREB (Cyclic adenosine 3'-5' monophosphate (cAMP) response element (CRE) binding protein) au niveau de l'hippocampe après 3 jours de labyrinthe aquatique (Sun et al. 2006). Les auteurs émettent alors l'hypothèse que l'augmentation de l'expression de ces trois messagers intervient dans l'augmentation des facultés d'apprentissage dans le labyrinthe aquatique. Par ailleurs, des rats Wistar soumis à un autre type de stress multiple (contention, position verticale, éclairage en période nocturne) pendant 6 semaines présentent également une augmentation des capacités d'apprentissage lors d'un test de labyrinthe aquatique (Li et al. 2007). Ces auteurs observent, au niveau de l'hippocampe, une augmentation concomitante de l'expression de Fyn, BDNF et TrkB associée, selon eux, à une augmentation des capacités d'apprentissage.

Les résultats de notre étude révèlent que l'application du test PCA seul ne se traduit par aucun changement des capacités d'apprentissage des animaux ni aucune modulation de l'activité transcriptionnelle des trois gènes BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  au niveau de l'hippocampe. Il semble que,

comme discuté précédemment, l'application du test PCA modifié n'ait pas été assez longue pour induire un effet observable sur les capacités d'apprentissage lors du test du labyrinthe aquatique. Par ailleurs, l'association du stress et du traitement par la PB induit des modifications géniques que d'autres équipes corrèlent à un meilleur apprentissage. Une augmentation des facultés d'apprentissage aurait alors été attendue chez les animaux traités et soumis au test PCA. Pourtant, lors du test du labyrinthe aquatique, ces mêmes animaux apprennent moins vite que les autres. Différentes hypothèses peuvent être émises afin d'expliquer ce phénomène contradictoire :

- la première hypothèse envisagée fait intervenir la modification de la balance MR/GR par le traitement par la PB. Cette modification conduirait à un défaut de la réponse au stress chez ces animaux. Cette hypothèse est en accord avec les travaux de Ferguson et Sapolsky (Ferguson & Sapolsky 2007) qui ont montré que la surexpression des MR régule la consolidation de la mémoire chez les rats. Cette augmentation de l'expression des MR est également retrouvée chez les rats Lewis, animaux caractérisés par une hyporéponse de l'axe HPA au stress (Oitzl et al. 1995).

- la seconde hypothèse concerne l'expression plus élevée de CamKII chez les animaux stressés ayant reçu la PB. En effet, des souris transgéniques surexprimant CamKII présentent des difficultés d'apprentissage dans un labyrinthe aquatique (Bejar et al. 2002). Les auteurs supposent alors que de faibles taux de CamKII faciliteraient les capacités d'apprentissage et qu'une augmentation des taux de cette protéine se traduirait par des défauts d'apprentissage dans un test de labyrinthe aquatique. Ces résultats n'ont cependant jamais été reproduits par d'autres équipes.

Au vu de ces différentes données, il semble que la PB, en modifiant la balance MR/GR, soit responsable d'une modification de la réponse au stress. Ainsi même si la PB seule n'induit aucun effet sur les capacités d'apprentissage, son association avec le stress se traduit par des modifications moléculaires de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  conduisant à un retard d'apprentissage. Le(s) mécanisme(s) reliant la balance MR/GR aux modifications de l'expression génique consécutives à l'association stress-PB (BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$ ) reste à établir pour expliquer le développement des effets secondaires comportementaux observés jusqu'à 6 mois après arrêt du stress et du traitement (Lamproglou et al. 2009).



**- PERSPECTIVES -**



## **Perspectives**

Les travaux conduits lors de cette étude mettent en évidence que le traitement répété par la pyridostigmine se traduit par une modification de la balance MR/GR au niveau cérébral. Ceci pourrait induire une modification de la réponse au stress chez les animaux stressés ayant reçu la PB. Par ailleurs, alors que l'augmentation de l'expression de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  a été corrélée à une amélioration de l'apprentissage, nos animaux stressés et traités par la PB présentent un défaut d'apprentissage dès J15.

Différents mécanismes restent donc à éclaircir :

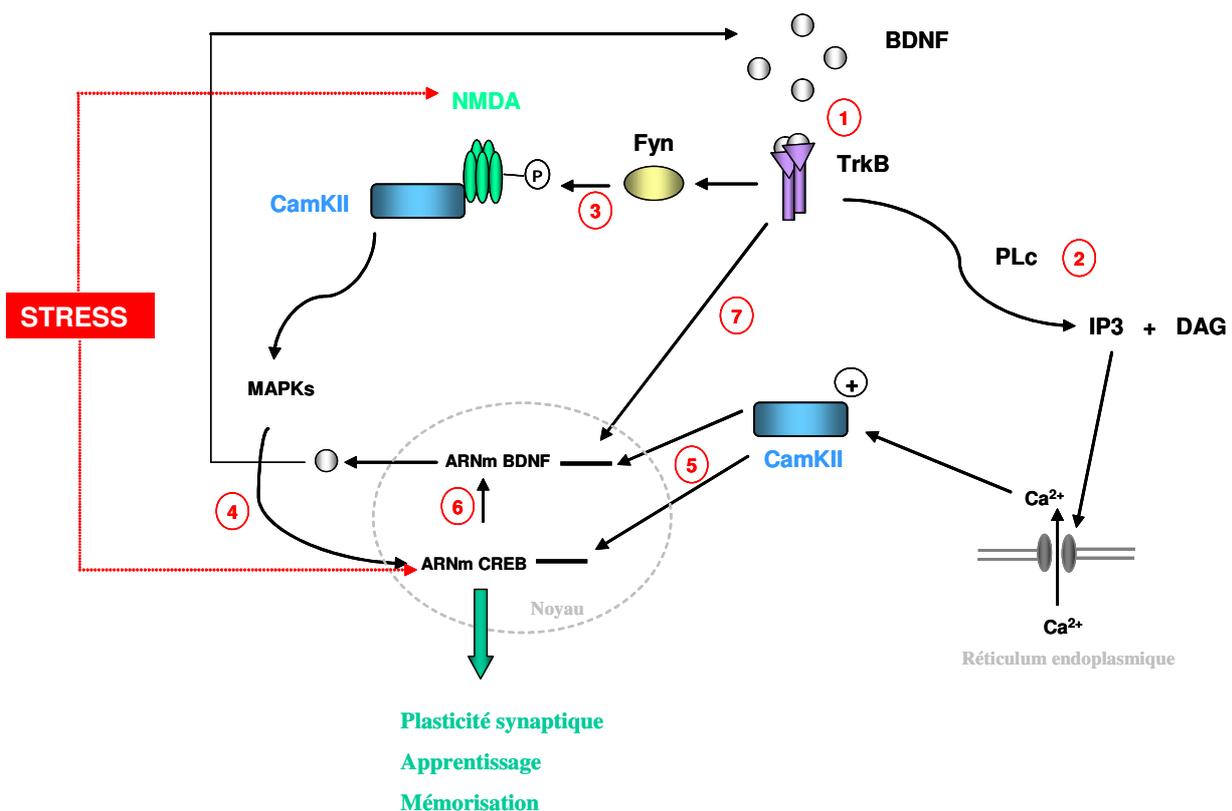
- Tout d'abord, il serait nécessaire de déterminer comment la PB modifie la balance MR/GR et donc la réponse au stress des animaux. Les données bibliographiques ne nous ont pas permis d'établir un lien entre un inhibiteur cholinestérasique périphérique et la modulation de l'expression de ces récepteurs au niveau du SNC.

- Un second mécanisme important à élucider concerne les résultats observés dans le labyrinthe aquatique. En effet, bien que l'association du stress et de la PB pendant 10 jours induise des changements moléculaires en faveur d'une augmentation des facultés d'apprentissage, ces animaux présentent un retard d'apprentissage dans le labyrinthe aquatique. Une étude supplémentaire portant sur l'évaluation des protéines traduites à partir de ces gènes serait intéressante afin de vérifier que l'augmentation de la transcription observée conduise bien à une modulation protéique par le stress, le traitement ou leur association. En effet, différentes régulations interviennent au niveau de la transcription, de l'ARNm puis de la traduction. La compréhension de ces mécanismes impose de doser les protéines codées par ces ARN.

- Enfin, nos résultats démontrant une activation de la voie du BDNF chez les animaux stressés ayant reçu la PB, il serait intéressant de tenter d'identifier les différents acteurs de la cascade moléculaire permettant d'expliquer le lien entre l'activation de cette voie et les modifications du comportement observées chez nos animaux. Des études complémentaires ciblant des molécules appartenant à la voie du BDNF semblent donc nécessaires. Même si le lien existant entre ces trois gènes BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  reste encore incertain, le facteur de transcription CREB, les récepteurs glutamatergiques NMDA ainsi que la protéine Fyn qui les phosphoryle semblent impliqués (Vaynman et al. 2003; Li et al. 2007; Vaynman et al. 2007). La protéine Fyn appartient à famille des tyrosines kinases Src. Abondamment exprimée au niveau des neurones, cette protéine est associée aux

récepteurs NMDA (Salter 1998). La stimulation de TrkB par le BDNF induit son association avec Fyn qui une fois activée peut se lier au récepteur NMDA (Mizuno et al. 2003; Xu et al. 2006). Par ailleurs, une étude réalisée sur des coupes d'hippocampe montre l'existence d'une interaction entre CamKII et la sous-unité NR2B du récepteur NMDA (Schulman 2004). Cette liaison permettrait de bloquer la kinase dans une conformation active même après dissociation de la calmoduline (Bayer et al. 2001). Une fois activée, CamKII peut phosphoryler le facteur de transcription CREB (Blanquet et al. 2003). En effet, l'utilisation de KN62, inhibiteur spécifique de CamKII, diminue la transcription de CREB *in vitro* (Schwaninger et al. 1993) comme *in vivo* (Vaynman et al. 2007). Le facteur de transcription CREB est quant à lui capable d'initier la transcription du BDNF (Finkbeiner 2000).

Les mécanismes d'activation de CamKII semblent donc complexes. Au vu des données bibliographiques, différents schémas d'activation de cette molécule peuvent être envisagés (figure 48) :



**Figure 48** : schéma des différentes voies d'activation de CamKII dans l'hippocampe.

- l'augmentation de l'expression de l'ARNm du BDNF, si elle est corrélée à une augmentation des taux protéiques de la molécule, se traduit par l'interaction du BDNF avec son récepteur TrkB (**Figure 48, 1**). Cette liaison induit l'activation de la voie de la phospholipase C (**Figure 48, 2**) générant alors de l'IP<sub>3</sub> et du DAG. Ces deux composés entraînent la libération de calcium à partir des stocks intracellulaires. Ce calcium peut alors activer CamKII (Blanquet & Lamour 1997; Minichiello et al. 2002) capable d'initier la transcription de CREB, TrkB et BDNF ;
- un second mécanisme d'activation de CamKII implique les récepteurs NMDA via l'activation de la molécule Fyn par TrkB (**Figure 48, 3**). L'activation des récepteurs NMDA entraîne CamKII vers la cascade des MAPKs afin de moduler la plasticité synaptique impliquée dans les processus d'apprentissage et de mémorisation (Blanquet et al. 2003). Dans ces conditions, CamKII stimule une molécule appelée p38 appartenant à la famille des MAPKs. Celle-ci induit la phosphorylation du facteur de transcription CREB (Blanquet et al. 2003; **figure 48, 4**). Les mécanismes par lesquels CamKII intervient pour induire cette phosphorylation restent indéterminés bien que l'implication de CamKII dans la transduction CRE-dépendante ait été montrée *in vivo* (Shieh et al. 1998). L'activation de CamKII induit la transcription de CREB (**Figure 48, 5**) agissant lui-même sur la transcription du BDNF (**Figure 48, 6**).

Ces deux voies semblent donc étroitement liées puisque, chez le Rat, l'administration d'un inhibiteur des récepteurs NMDA (MK-801) abolit l'augmentation de l'expression de BDNF, TrkB et CREB normalement observée suite à un stress physique (Vaynman et al. 2003). Par ailleurs, on assiste à une boucle de rétrocontrôle puisqu'en agissant via son récepteur, le BDNF est capable d'initier la synthèse de son propre ARNm (**Figure 48, 7**) et celle de son récepteur.

En ce qui concerne l'action du stress sur ces voies, il semble intervenir à différents niveaux. En effet, l'existence d'un lien entre les glucocorticoïdes et le facteur de transcription CREB a été prouvée (Barnes 1998; Focking et al. 2003). De plus, les glucocorticoïdes pourraient agir par l'intermédiaire de la recapture du glutamate et par l'activation de l'expression de la sous-unité NR2B du récepteur NMDA (Inoue et al. 1994; Kim & Yoon 1998).

Toutes ces voies conduisent à l'expression de CREB, facteur de transcription impliqué dans la plasticité synaptique et par voie de conséquence dans les processus d'apprentissage et de mémorisation.

En résumé, l'application du test PCA modifié seul n'induit aucune augmentation de l'expression de BDNF, TrkB et CamKII $\alpha$  et n'engendre pas d'effet sur l'apprentissage des animaux. Au contraire, l'association du PCA modifié au traitement par la PB induit des modifications de l'expression de ces

gènes et un retard d'apprentissage. Il est alors possible d'envisager que, sous l'effet du stress, l'administration périphérique de PB puisse agir au niveau des différents acteurs des voies précédemment décrites. La balance MR/GR modifiée par le traitement pourrait intervenir à ce niveau sans que le mécanisme ne soit, à l'heure actuelle, identifié. Le facteur de transcription CREB étant impliqué dans la plasticité synaptique lors des processus d'apprentissage, nous pouvons supposer que, sous l'effet du stress, la PB puisse intervenir sur sa transcription induisant de ce fait des conséquences sur la mise en place des processus d'apprentissage. Par ailleurs, une inhibition ou une délétion des récepteurs NMDA se traduisant par un défaut d'apprentissage spatial (Sakimura et al. 1995; Tsien et al. 1996), il est envisageable qu'une action de la PB à ce niveau puisse également induire des troubles de l'apprentissage.

Afin de tenter d'expliquer l'enchaînement de ces événements moléculaires, l'identification des conséquences du stress et du traitement à des délais plus précoces apparaît nécessaire tant au niveau génique que protéique. Ceci est étayé par le fait que nous n'avons mis en évidence aucune modulation de l'expression génique à J22, soit 10 jours après l'arrêt du stress et du traitement. Les effets sur l'expression des gènes impliquent donc des mécanismes agissant à des délais courts. Une étude nous permettant d'évaluer les modifications d'expression génique induites par notre protocole délai par délai, de J1 à J12, ainsi qu'immédiatement après une séance de rappel du PCA sans application du choc électrique, semble donc essentielle. Finalement, l'évaluation de l'expression de gènes impliqués dans différents types de comportement (social, anxiété, cognition) pourrait permettre une meilleure compréhension des symptômes engendrés par l'association du stress et du traitement par la PB.

**- CONCLUSION GENERALE -**



Le but de cette étude était d'évaluer, au niveau du SNC, les effets secondaires de la prise de PB lorsque le traitement est administré en situation de stress répété. Les conséquences du traitement ont particulièrement été étudiées sur les capacités d'apprentissage des animaux dans un labyrinthe aquatique. Par ailleurs, l'influence du stress et du traitement a été évaluée sur l'expression de gènes dans différentes structures cérébrales choisies pour leur implication dans les processus cognitifs et la gestion du stress.

Dans un premier temps, cette étude nous a permis de valider, tant d'un point de vue biologique que moléculaire, un nouveau modèle de stress psychologique, que les animaux devaient être à même de gérer. Les rats soumis à ce nouveau modèle de stress pendant dix jours présentent une perte de poids, une augmentation des taux plasmatiques d'aldostérone et de corticostérone ainsi que de l'expression de gènes marqueurs du stress au niveau cérébral. Dans un second temps, la dose et la voie d'administration de la PB ont été validées : elles ont conduit à une inhibition de l'activité AChE périphérique similaire à celle recommandée par l'OTAN dans le cadre de la prophylaxie chez l'Homme. Ainsi, ces deux modèles associés (stress + traitement par la PB) nous ont permis de mimer certaines des conditions vécues par les soldats lors de la première guerre du Golfe.

Alors que le modèle de stress utilisé ne se traduit par aucune modification des capacités d'apprentissage des animaux, les rats stressés ayant reçu la PB présentent un retard d'apprentissage lors du test du labyrinthe aquatique, débuté 3 jours après la fin du stress et du traitement. Par une approche de biologie moléculaire, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression des récepteurs aux minéralocorticoïdes de l'hypothalamus, suite au traitement répété par la PB. Ceci suggère que le traitement par la PB modifie la réponse au stress des animaux, hypothèse que confortent les modifications géniques observées chez les animaux stressés et traités. En effet, au dernier jour de l'association du stress et du traitement, nous observons, dans l'hippocampe, une augmentation de l'expression de gènes qui, d'après la littérature, serait en faveur d'un meilleur apprentissage (BDNF, TrkB et CamKII). Pourtant, trois jours après arrêt du stress et du traitement, les facultés d'apprentissage des animaux sont amoindries et ces perturbations perdurent jusqu'à 6 mois après arrêt du traitement associé au stress (Lamproglou et al., 2009). Les liens existant entre le traitement par la PB et les effets géniques et comportementaux observés chez les animaux traités et stressés nous semblent, à l'heure actuelle, difficiles à établir. Une action directe de la PB au niveau cérébral semble peu probable puisque nous n'avons mis en évidence aucune inhibition de l'activité cholinestérasique cérébrale ni immédiatement après la dernière séance de stress, ni 10 jours plus tard. La PB administrée en situation de stress pourrait, plus probablement, interagir au niveau de synapses cholinergiques du système autonome impliqué dans la réaction au stress.

Afin de tenter d'établir la cascade d'évènements conduisant au retard d'apprentissage que nous observons chez les animaux traités et stressés, des études complémentaires ciblant notamment le facteur de transcription CREB et les récepteurs NMDA seraient intéressantes. L'expression de ces

molécules devrait être analysée tant en terme de messenger que de protéine. De même, la vérification de la phosphorylation de CamKII permettrait de s'assurer de la transduction d'un éventuel signal par cette molécule. Enfin, des prélèvements effectués à chaque délai du protocole nous permettraient d'établir une cinétique de l'activation de ces différentes molécules.

Bien que cette étude mette en évidence un effet de la PB au niveau du SNC, y compris lorsqu'elle n'est pas associée au stress (modulation de la balance MR/GR), il est à l'heure actuelle impossible d'envisager la suppression de ce traitement dans le cadre de la prophylaxie en cas de menace chimique, principalement en cas de risque d'intoxication au soman.

D'autres molécules sont à l'heure actuelle à l'étude dans le cadre d'un éventuel remplacement de la pyridostigmine. Ainsi, l'huperzine A, molécule en phase finale d'essai clinique pour le traitement de la maladie d'Alzheimer en Chine, est un inhibiteur spécifique de l'AChE. L'Huperzine A présente un temps de demi-vie plus élevé que la PB (5 à 6 heures) et possède la faculté de traverser la BHE. Contrairement à la PB, cette molécule peut donc protéger les cholinestérasés cérébrales. Il semble cependant nécessaire de souligner l'aspect contradictoire de certaines études. En effet, en cas d'intoxication par les NOPs, la protection de l'activité cholinestérasique cérébrale semble primordiale. Cette protection doit cependant être dépourvue d'effets secondaires au niveau du SNC. Au vu des études montrant que la PB, anticholinestérasique périphérique, peut avoir des effets secondaires centraux, l'utilisation d'Huperzine A dans le cadre du pré-traitement prophylactique nécessitera des études montrant son innocuité, en particulier si elle est combinée au stress ou à d'autres composés chimiques utilisés pendant les conflits.

Par ailleurs, les techniques de génie génétique permettent de produire une BuChE recombinante humaine à partir de lait de chèvre. Cette molécule baptisée Protexia<sup>®</sup> vient d'obtenir l'approbation de la FDA (Food and Drug Administration) américaine pour son utilisation lors d'essais cliniques (phase 2) chez l'Homme. Un litre de lait de chèvres transgéniques permet de produire de 0,1 à 5 g de BuChE. Cette enzyme recombinante, agissant comme une « éponge » pour capturer et inhiber les NOPs, possède la faculté de persister dans le plasma humain pendant deux semaines. Ainsi une administration unique, avant intoxication potentielle, permettrait de protéger l'Homme sur une durée plus longue que la PB. Une seule injection de 200 mg de BuChE permet de protéger l'organisme contre une dose de NOPs allant jusqu'à 5 fois la DL50 du soman et du VX chez l'animal. En cas de conflit, il est cependant difficile d'évaluer la dose de toxique utilisée. Aussi, le traitement post-exposition reste tout de même nécessaire. Il est à noter que la PB a récemment obtenu, en France, l'AMM pour son utilisation en tant que traitement prophylactique contre les NOPs. L'obtention d'une telle AMM pour la BuChE recombinante humaine nécessitera un délai justifiant probablement l'utilisation pendant plusieurs années encore de la Pyridostigmine.

**- COMMUNICATIONS -**



Ce travail a fait l'objet des communications suivantes :

**Congrès :**

**Effets centraux d'un pré-traitement à la pyridostigmine administré en situation de stress.**

L. Barbier, I. Lamproglou, M. Diserbo, A. Dessois, A. Peinnequin, C. Amourette et W. Fauquette.  
34<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, 15-19 octobre 2007, Ile des Embiez (Poster).

**Central effects of pyridostigmine bromide treatment in repeated stressed rats.**

L. Barbier, I. Lamproglou, M. Diserbo, C. Amourette, A. Dessois, A. Peinnequin et W. Fauquette.  
Stress and behavior congress, 16-20 mai 2008, St Pétersbourg (présentation orale).

**Publications :**

**Repeated stress in combination with pyridostigmine. Part I – Long-term behavioural consequences.**

I. Lamproglou, L. Barbier, M. Diserbo, F. Fauvelle, W. Fauquette, C. Amourette. Behavioural Brain Research, 197 : 292-300, 2009.

**Repeated stress in combination with pyridostigmine. Part II – Changes in cerebral genes expression.**

L. Barbier, M. Diserbo, I. Lamproglou, C. Amourette, A. Peinnequin, W. Fauquette. Behavioural Brain Research, 197 : 301-310, 2009.



**- ANNEXES -**



## Liste des annexes

**Annexe 1** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons de l'hypothalamus et de l'hippocampe

**Annexe 2** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons du striatum et du cortex frontal

**Annexe 3** : Plan de coupe du striatum postérieur

**Annexe 4** : Plan de coupe de l'hippocampe antérieur

**Annexe 5** : Tableau récapitulatif des différents anticorps, et leur dilution, utilisés lors de l'étude immunohistologique

**Annexe 1a** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons de l'hypothalamus et de l'hippocampe

(ND : non déterminé)

Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	HYPOTHALAMUS			HIPPOCAMPE			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	
ARBP	NM_022402	Sens	CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG	4	0,5	55	4	0,5	54
		Anti-sens							
CycA	NM_017101	Sens	AGCATGTGGTCTTTGGGAAGGTG CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC	4	0,5	56	4	0,5	55
		Anti-sens							
HPRT	NM_012583	Sens	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC	4	0,4	58	4	0,4	56
		Anti-sens							
CamKII $\alpha$	NM_012920	Sens	AGATGTGCGACCCTGGAATGAC CGGGACCACAGGTTTTCAAATAG	4	0,4	56	4	0,5	56
		Anti-sens							
BDNF	NM_012513	Sens	TTACCTCTTGGGGTTAGGAGAAGTC TCACTAGGGAAATGGGCTTAACAC	ND	ND	ND	4	0,4	55
		Anti-sens							
TrkB	NM_012731	Sens	CGGAACTGCTTGGTAGGAGAGAAC CGGATGGGCAACATTGTGTG	4	0,4	55	4	0,4	57
		Anti-sens							

**Annexe 1b** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons de l'hypothalamus et de l'hippocampe

Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	HYPOTHALAMUS			HIPPOCAMPE			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	
<b>Hsp70 II</b>	NM_031971	Sens	ACCATCGAGGAGGTGGATTAGAGG	4	0,5	56	4	0,5	62
		Anti-sens	ACCAGCAGCCATCAAGAGTCTGTC						
<b>I-κB</b>	XM_343065	Sens	AGCTGACCCTGGAAAATCTTCAG	4	0,5	57	4	0,5	57
		Anti-sens	CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG						
<b>MR</b>	NM_013131	Sens	GCAGAGGTTCTACCAACTGACCAAG	4	0,4	57	4	0,4	57
		Anti-sens	ACCTTCAGAGCCTGGGATTCTC						
<b>GR</b>	NM_012576	Sens	GCCTTGGGTTGGAGATCATAACAG	4	0,4	57	4	0,4	58
		Anti-sens	TTGGTCATACATGCAGGGTAGAGAC						
<b>c-Fos</b>	NM_022197	Sens	CGGAGAATCCGAAGGGAAAAG	4	0,4	55	4	0,5	56
		Anti-sens	TGGCAATCTCGGTCTGCAAC						
<b>c-Jun</b>	NM_021835	Sens	CAATGGGCACATCACCCTACAC	4	0,5	61	4	0,5	58
		Anti-sens	TCTGGCTATGCAGTTCAGCTAGG						

***Annexe 1c*** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons de l'hypothalamus et de l'hippocampe

Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	HYPOTHALAMUS			HIPPOCAMPE			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (μM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (μM)	Température d'hybridation (°C)	
<b>MCIP1</b>	NM_153724	Sens	GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT	4	0,4	60	4	0,4	60
		Anti-sens	TTGGCCCTGGTCTCACTTTC						
<b>II-1α</b>	NM_017019	Sens	AAGACAAGCCTGTGTTGCTGAAGG	4	0,4	63	4	0,4	63
		Anti-sens	TCCCAGAAGAAAATGAGGTCCGGTC						
<b>AChE</b>	NM_172009	Sens	GCGACTTATGCAATACTGGACCAA	4	0,4	56	4	0,5	56
		Anti-sens	TCCCAGAAGAAAATGAGGTCCGGTC						
<b>GFAP</b>	NM_017009	Sens	ACCAGCCTGGACACCAAATCTG	5	0,5	54	5	0,5	55
		Anti-sens	CCACCGTCTTTACCACGATGTTTC						
<b>S100β</b>	NM_013191	Sens	TTGGACACCGAAGCCAGAGA	4	0,5	54	4	0,5	55
		Anti-sens	AAGACATCAATGAGGGCAACCAT						
<b>CRF</b>	NM_031019	Sens	TGGATCTCACCTTCCACCTTCTG	4	0,5	58	4	0,4	58
		Anti-sens	TTCCTGTTGCTGTGAGCTTGC						

***Annexe 2a*** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons du striatum et du cortex frontal

Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	STRIATUM			CORTEX FRONTAL			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (μM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (μM)	Température d'hybridation (°C)	
<b>ARBP</b>	NM_022402	Sens	CCTGCACACTCGCTTCCTAGAG	4	0,5	55	4	0,5	55
		Anti-sens	CAACAGTCGGGTAGCCAATCTG						
<b>CycA</b>	NM_017101	Sens	AGCATGTGGTCTTTGGGAAGGTG	4	0,5	56	4	0,5	56
		Anti-sens	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC						
<b>HPRT</b>	NM_012583	Sens	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC	4	0,4	58	4	0,4	56
		Anti-sens	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC						
<b>CamKIIα</b>	NM_012920	Sens	AGATGTGCGACCCTGGAATGAC	4	0,5	57	4	0,5	57
		Anti-sens	CGGGACCACAGGTTTTCAAAATAG						
<b>BDNF</b>	NM_012513	Sens	TTACCTCTTGGGGTTAGGAGAAGTC	4	0,4	55	4	0,4	55
		Anti-sens	TCACTAGGGAAATGGGCTTAACAC						
<b>TrkB</b>	NM_012731	Sens	CGGAACTGCTTGGTAGGAGAGAAC	4	0,4	57	4	0,4	57
		Anti-sens	CGGATGGGCAACATTGTGTG						

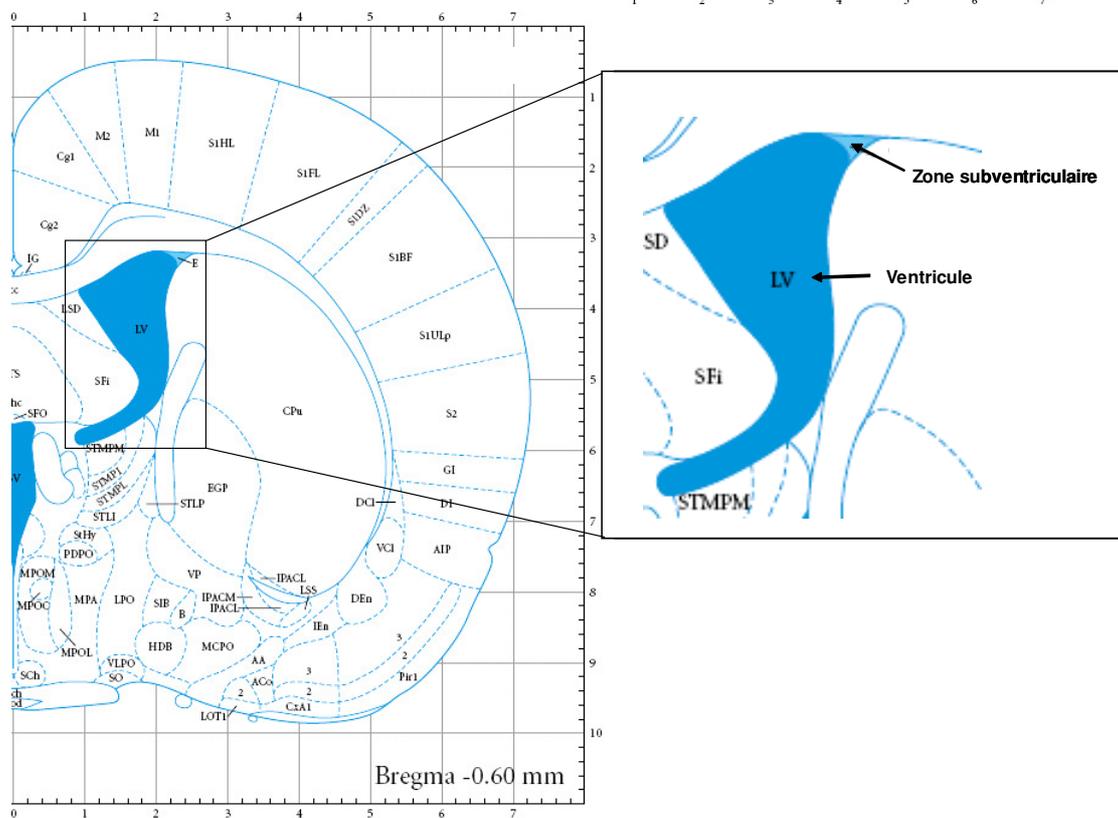
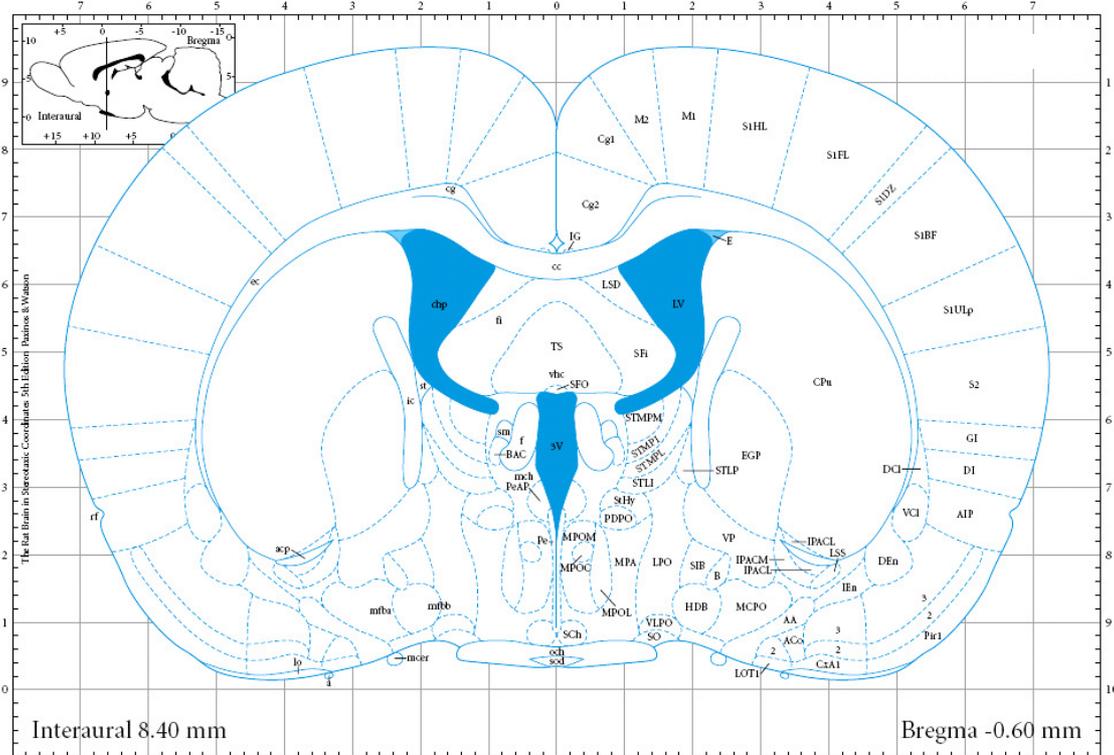
**Annexe 2b** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons du striatum et du cortex frontal

Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	STRIATUM			CORTEX FRONTAL			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	
<b>Hsp70 II</b>	NM_031971	Sens	ACCATCGAGGAGGTGGATTAGAGG	4	0,5	58	4	0,5	58
		Anti-sens	ACCAGCAGCCATCAAGAGTCTGTC						
<b>I-κB</b>	XM_343065	Sens	AGCTGACCCTGGAAAATCTTCAG	4	0,5	57	4	0,5	57
		Anti-sens	CCTCCAAACACACAGTCATCGTAG						
<b>MR</b>	NM_013131	Sens	GCAGAGGTTCTACCAACTGACCAAG	4	0,4	57	4	0,4	57
		Anti-sens	ACCTTCAGAGCCTGGGATTCTC						
<b>GR</b>	NM_012576	Sens	GCCTTGGGTTGGAGATCATACAG	4	0,4	58	5	0,4	60
		Anti-sens	TTGGTCATACATGCAGGGTAGAGAC						
<b>c-Fos</b>	NM_022197	Sens	CGGAGAATCCGAAGGGAAAG	4	0,4	57	4	0,4	57
		Anti-sens	TGGCAATCTCGGTCTGCAAC						
<b>c-Jun</b>	NM_021835	Sens	CAATGGGCACATCACCCTACAC	5	0,4	60	4	0,5	60
		Anti-sens	TCTGGCTATGCAGTTCAGCTAGG						

**Annexe 2c** : Séquences des amorces et conditions de PCR utilisées pour les échantillons du striatum et du cortex frontal

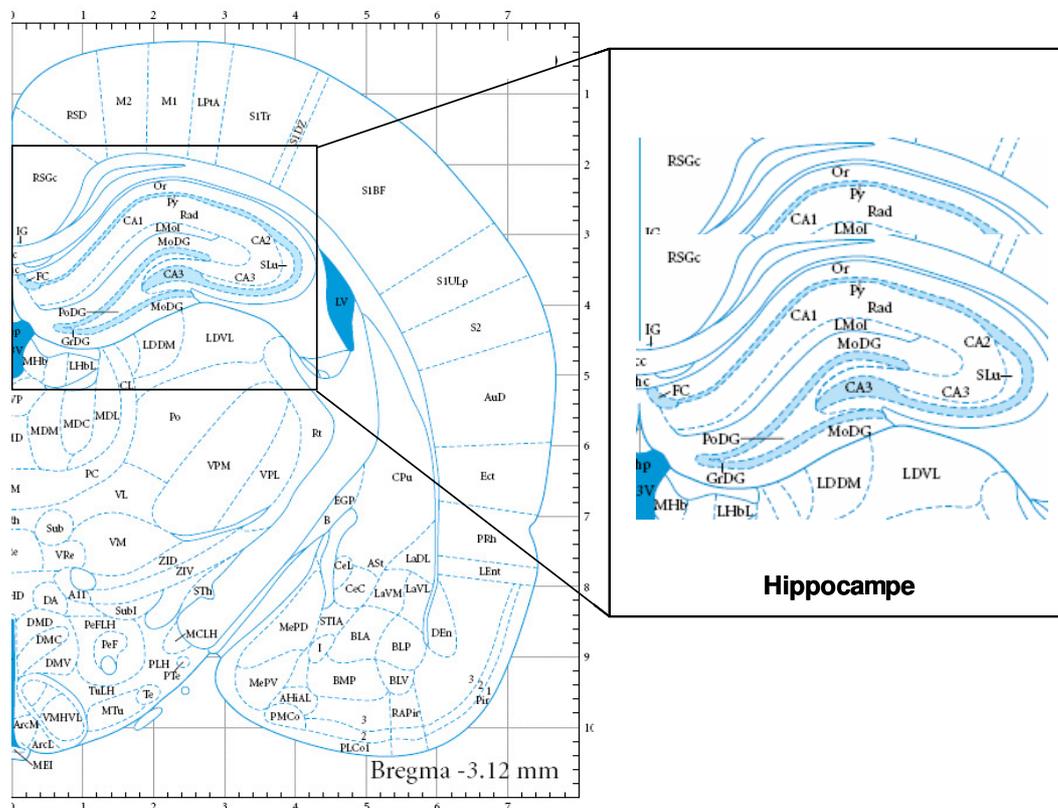
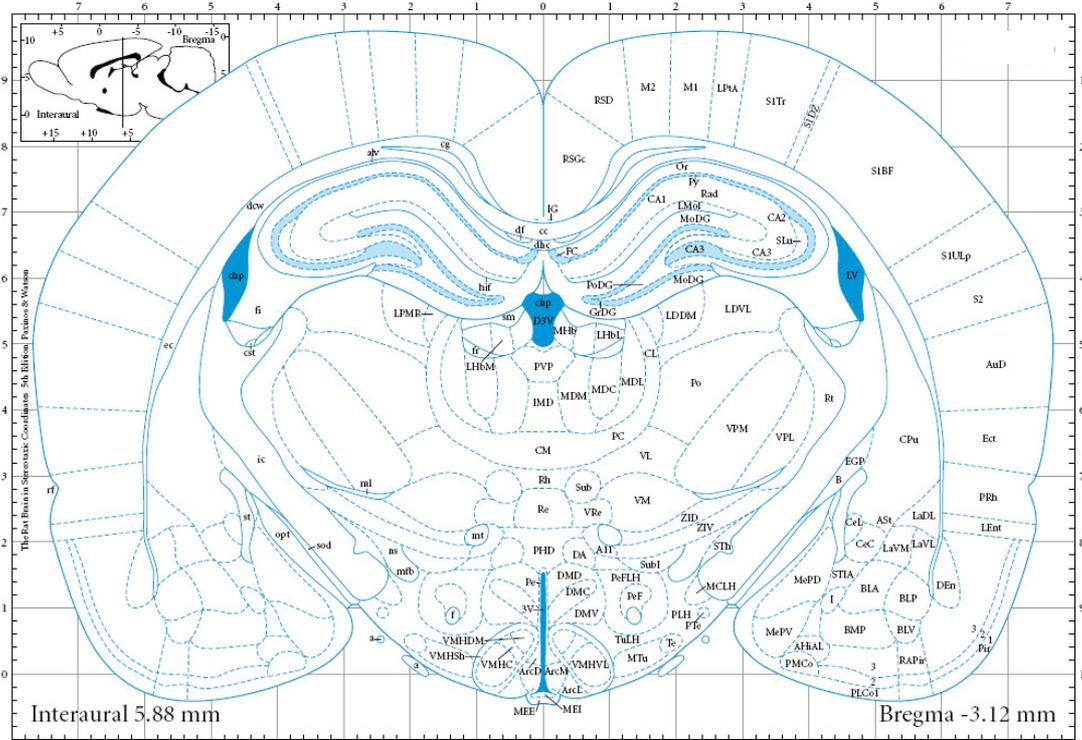
Gène	Numéro d'accèsion GenBank	Séquence amorce 5'-3'	STRIATUM			CORTEX FRONTAL			
			[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	[Mg <sup>2+</sup> ] (mM)	[amorces] (µM)	Température d'hybridation (°C)	
<b>MCIP1</b>	NM_153724	Sens	GACTTTAACTACAATTTTAGCTCCCTGAT	4	0,4	60	4	0,4	60
		Anti-sens	TTGGCCCTGGTCTCACTTTC						
<b>Il-1α</b>	NM_017019	Sens	AAGACAAGCCTGTGTTGCTGAAGG	4	0,4	63	4	0,4	63
		Anti-sens	TCCCAGAAGAAAATGAGGTCGGTC						
<b>AChE</b>	NM_172009	Sens	GCGACTTATGCAATACTGGACCAA	4	0,4	56	4	0,5	54
		Anti-sens	TCCCAGAAGAAAATGAGGTCGGTC						
<b>GFAP</b>	NM_017009	Sens	ACCAGCCTGGACACCAAATCTG	5	0,4	54	5	0,4	54
		Anti-sens	CCACCGTCTTTACCACGATGTTTC						
<b>S100β</b>	NM_013191	Sens	TTGGACACCGAAGCCAGAGA	5	0,4	54	5	0,4	54
		Anti-sens	AAGACATCAATGAGGGCAACCAT						
<b>CRF</b>	NM_031019	Sens	TGGATCTCACCTTCCACCTTCTG	4	0,5	58	4	0,4	58
		Anti-sens	TTCCTGTTGCTGTGAGCTTGC						

**Annexe 3 :** Plan de coupe correspondant au striatum postérieur (Bregma -0,8 à -1,4) Au niveau de cette région cérébrale, nous nous sommes particulièrement intéressés à la zone subventriculaire.



D'après l'Atlas « The Rat Brain in stereotaxic coordinates » 5<sup>ème</sup> édition Paxinos et Watson (Academic Press 2005).

**Annexe 4 :** Plan de coupe correspondant à l'hippocampe antérieur (Bregma -2,56 à -3,6). Ce plan nous permet d'observer les différentes zones de cette structure.



D'après l'Atlas « The Rat Brain in stereotaxic coordinates » 5<sup>ème</sup> édition Paxinos et Watson (Academic Press 2005).

**Annexe 5** : Tableau récapitulatif des différents anticorps, et leur dilution, utilisés lors de notre étude immunohistologique.

<b>Immunomarquage</b>	<b>Anticorps primaire</b>	<b>Dilution anticorps primaire</b>	<b>Anticorps secondaire</b>	<b>Dilution anticorps secondaire</b>
<b>BrdU</b>	anti-BrdU monoclonal préparé chez la souris	1/50	IgG biotinylé anti-souris	1/50
<b>Claudine 5</b>	anti-Claudine 5 polyclonal préparé chez le lapin	1/50	IgG biotinylé anti-lapin	1/50
<b>Albumine</b>	Anti-albumine polyclonal préparé chez le mouton	1/200	IgG biotinylé anti-mouton	1/50
<b>IgG</b>	Anti-IgG polyclonal biotinylé préparé chez la chèvre	1/50	—	
<b>AChE</b>	Anti-AChE monoclonal préparé chez la souris	1/100	IgG biotinylé anti-souris	1/50



**- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES -**



1. Abdel-Rahman, A., A. K. Shetty & M. B. Abou-Donia: Disruption of the blood-brain barrier and neuronal cell death in cingulate cortex, dentate gyrus, thalamus, and hypothalamus in a rat model of Gulf-War syndrome. *Neurobiol Dis* 2002, **10**, 306-26.
2. Abdel-Rahman, A., S. Abou-Donia, E. El-Masry, A. Shetty & M. Abou-Donia: Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Toxicol Environ Health A*. 2004, **67**, 163-92.
3. Abou-Donia, M. B., K. R. Wilmarth, A. A. Abdel-Rahman, K. F. Jensen, F. W. Oehme & T. L. Kurt: Increased neurotoxicity following concurrent exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and chlorpyrifos. *Fundam Appl Toxicol*. 1996, **34**, 201-22.
4. Abou-Donia, M. B., L. B. Goldstein, K. H. Jones, A. A. Abdel-Rahman, T. V. Damodaran, A. M. Dechkovskaia, S. L. Bullman, B. E. Amir & W. A. Khan: Locomotor and sensorimotor performance deficit in rats following exposure to pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin, alone and in combination. *Toxicol Sci*. 2001, **60**, 305-14.
5. Abou-Donia, M. B.: Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. *Arch Environ Health* 2003, **58**, 484-97.
6. Abu-Qare, A. W. & M. B. Abou-Donia: A validated HPLC method for the determination of pyridostigmine bromide, acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine in rat plasma and urine. *J Pharm Biomed Anal* 2001, **26**, 939-47.
7. Abu-Qare, A. W. & M. B. Abou-Donia: In vitro metabolism and interactions of pyridostigmine bromide, N,N-diethyl-m-toluamide, and permethrin in human plasma and liver microsomal enzymes. *Xenobiotica* 2008, **38**, 294-313.
8. Adcock, I. M., G. Caramori & K. Ito: New insights into the molecular mechanisms of corticosteroids actions. *Curr Drug Targets* 2006, **7**, 649-60.
9. Aguilera, G., A. Kiss, X. Luo & B. S. Akbasak: The renin angiotensin system and the stress response. *Ann N Y Acad Sci* 1995, **771**, 173-86.
10. Aicardi, G., E. Argilli, S. Cappello, S. Santi, M. Riccio, H. Thoenen & M. Canossa: Induction of long-term potentiation and depression is reflected by corresponding changes in secretion of endogenous brain-derived neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**, 15788-92.
11. Akcetin, Z., R. Pregla, D. Darmer, H. Heynemann, J. Haerting, H. J. Bromme & J. Holtz: Differential expression of heat shock proteins 70-1 and 70-2 mRNA after ischemia-reperfusion injury of rat kidney. *Urol Res* 1999, **27**, 306-11.

12. Amano, Y., S. W. Lee & A. C. Allison: Inhibition by glucocorticoids of the formation of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6: mediation by decreased mRNA stability. *Mol Pharmacol* 1993, **43**, 176-82.
13. Anderson, D. C., S. C. King & S. M. Parsons: Proton gradient linkage to active uptake of [3H]acetylcholine by Torpedo electric organ synaptic vesicles. *Biochemistry* 1982, **21**, 3037-43.
14. Antonini, G., S. Morino, F. Gragnani & M. Fiorelli: Myasthenia gravis in the elderly: a hospital based study. *Acta Neurol Scand* 1996, **93**, 260-2.
15. Aquilonius, S. M., S. A. Eckernas, P. Hartvig, B. Lindstrom & P. O. Osterman: Pharmacokinetics and oral bioavailability of pyridostigmine in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1980, **18**, 423-8.
16. Aquilonius, S. M. & P. Hartvig: Clinical pharmacokinetics of cholinesterase inhibitors. *Clin Pharmacokinet* 1986, **11**, 236-49.
17. Araneta, M. R., D. A. Destiche, K. M. Schlangen, R. D. Merz, M. B. Forrester & G. C. Gray: Birth defects prevalence among infants of Persian Gulf War veterans born in Hawaii, 1989-1993. *Teratology* 2000, **62**, 195-204.
18. Araneta, M. R., D. R. Kamens, A. C. Zau, V. M. Gastanaga, K. M. Schlangen, K. M. Hiliopoulos & G. C. Gray: Conception and pregnancy during the Persian Gulf War: the risk to women veterans. *Ann Epidemiol* 2004, **14**, 109-16.
19. Arfsten, D. P., D. J. Schaeffer, E. W. Johnson, J. Robert Cunningham, K. R. Still & E. R. Wilfong: Evaluation of the effect of implanted depleted uranium on male reproductive success, sperm concentration, and sperm velocity. *Environ Res* 2006, **100**, 205-15.
20. Armario, A.: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006, **5**, 485-501.
21. Armstead, V. E., I. L. Opentanova, A. G. Minchenko & A. M. Lefer: Tissue factor expression in vital organs during murine traumatic shock: role of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Anesthesiology* 1999, **91**, 1844-52.
22. Asea, A., S. K. Kraeft, E. A. Kurt-Jones, M. A. Stevenson, L. B. Chen, R. W. Finberg, G. C. Koo & S. K. Calderwood: HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med* 2000, **6**, 435-42.
23. Asea, A., M. Rehli, E. Kabingu, J. A. Boch, O. Bare, P. E. Auron, M. A. Stevenson & S. K. Calderwood: Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 2002, **277**, 15028-34.
24. Ashwell, J. D., F. W. Lu & M. S. Vacchio: Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 2000, **18**, 309-45.

25. Autelitano, D. J.: Stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AP-1 in hypothalamus and pituitary. *Brain Res Bull* 1998, **45**, 75-82.
26. Avital, A., I. Goshen, A. Kamsler, M. Segal, K. Iverfeldt, G. Richter-Levin & R. Yirmiya: Impaired interleukin-1 signaling is associated with deficits in hippocampal memory processes and neural plasticity. *Hippocampus*. 2003, **13**, 826-34.
27. Baeuerle, P. A. & T. Henkel: Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994, **12**, 141-79.
28. Baireddy, P., N. Mirajkar, A. Nallapaneni, N. Singleton & C. N. Pope: Effects of combined, multiple stressors on pyridostigmine-induced acute toxicity in rats. *Arch Toxicol* 2007, **81**, 283-89.
29. Bajgar, J.: The influence of inhibitors and other factors on cholinesterases. *Sb Ved Pr Lek Fak Karlovy Univerzity Hradci Kralove* 1991, **34**, 5-77.
30. Bajgar, J.: Prophylaxis against organophosphorus poisoning. *J Med Chem Def* 2004, **1**, 1-16.
31. Balkowiec, A. & D. M. Katz: Cellular mechanisms regulating activity-dependent release of native brain-derived neurotrophic factor from hippocampal neurons. *J Neurosci* 2002, **22**, 10399-407.
32. Bamberger, C. M., H. M. Schulte & G. P. Chrousos: Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocr Rev* 1996, **17**, 245-61.
33. Banasr, M., G. W. Valentine, X.Y. Li, S. L. Gourley, J. R. Taylor & R. S. Duman: Chronic unpredictable stress decreases cell proliferation in the cerebral cortex of the adult rat. *Biol Psychiatry* 2007, **62**, 496-504.
34. Barber, H. E., T. N. Calvey & K. T. Muir: The relationship between the pharmacokinetics, cholinesterase inhibition and facilitation of twitch tension of the quaternary ammonium anticholinesterase drugs, neostigmine, pyridostigmine, edrophonium and 3-hydroxyphenyltrimethylammonium. *Br J Pharmacol* 1979, **66**, 525-30.
35. Bardin, P. G., S. F. van Eeden, J. A. Moolman, A. P. Foden & J. R. Joubert: Organophosphate and carbamate poisoning. *Arch Intern Med* 1994, **154**, 1433-41.
36. Barnes, P. J.: Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998, **94**, 557-72.
37. Barnes, P. J.: Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur Respir J* 2006, **27**, 413-26.
38. Barreto-Medeiros, J., A. Queiros-Santos, J. E. Cabral-Filho, E. S. W. T. Ferreira, C. G. Leandro, T. C. Deiro, R. Manhaes-de-Castro & C. M. Machado Barbosa de-Castro:

- Stress/aggressiveness-induced immune changes are altered in adult rats submitted to neonatal malnutrition. *Neuroimmunomodulation* 2007, **14**, 229-334.
39. Barrientos, R. M., D. B. Sprunger, S. Campeau, L. R. Watkins, J. W. Rudy & S. F. Maier: BDNF mRNA expression in rat hippocampus following contextual learning is blocked by intrahippocampal IL-1beta administration. *J Neuroimmunol* 2004, **155**, 119-26.
40. Barros, M., R. S. Maior, J. P. Huston & C. Tomaz: Predatory stress as an experimental strategy to measure fear and anxiety-related behaviors in non-human primates. *Rev Neurosci* 2008, **19**, 157-69.
41. Bartolomucci, A., G. de Biurrun, B. Czeh, M. van Kampen & E. Fuchs: Selective enhancement of spatial learning under chronic psychosocial stress. *Eur J Neurosci* 2002, **15**, 1863-6.
42. Bartolomucci, A., P. Palanza, S. Parmigiani, T. Pederzani, E. Merlot, P. J. Neveu & R. Dantzer: Chronic psychosocial stress down-regulates central cytokines mRNA. *Brain Res Bull* 2003, **62**, 173-8.
43. Basu, S., R. J. Binder, R. Suto, K. M. Anderson & P. K. Srivastava: Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* 2000, **12**, 1539-46.
44. Bayer, K. U., P. De Koninck, A. S. Leonard, J. W. Hell & H. Schulman: Interaction with the NMDA receptor locks CaMKII in an active conformation. *Nature* 2001, **411**, 801-5.
45. Beck, K. D., G. Zhu, D. Beldowicz, F. X. Brennan, J. E. Ottenweller, R. L. Moldow & R. J. Servatius: Central nervous system effects from a peripherally acting cholinesterase inhibiting agent: interaction with stress or genetics. *Ann N Y Acad Sci* 2001, **933**, 310-4.
46. Beck, K. D., F. X. Brennan, R. L. Moldow, J. E. Ottenweller, G. Zhu & R. J. Servatius: Stress interacts with peripheral cholinesterase inhibitors to cause central nervous system effects. *Life Sci* 2003, **73**, 41-51.
47. Beekman, R., J. B. Kuks & H. J. Oosterhuis: Myasthenia gravis: diagnosis and follow-up of 100 consecutive patients. *J Neurol* 1997, **244**, 112-8.
48. Beere, H. M., B. B. Wolf, K. Cain, D. D. Mosser, A. Mahboubi, T. Kuwana, P. Taylor, R. I. Morimoto, G. M. Cohen & D. R. Green: Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2000, **2**, 469-75.
49. Beere, H. M. & D. R. Green: Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2001, **11**, 6-10.

50. Bejar, R., R. Yasuda, H. Krugers, K. Hood & M. Mayford: Transgenic calmodulin-dependent protein kinase II activation: dose-dependent effects on synaptic plasticity, learning, and memory. *J Neurosci* 2002, **22**, 5719-26.
51. Bekinschtein, P., M. Cammarota, C. Katze, L. Slipczuk, J.I. Rossato, A. Goldin, I. Izquierdo & J.H. Medina. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**, 2711-6.
52. Belova, I. & G. Jonsson: Blood-brain barrier permeability and immobilization stress. *Acta Physiol Scand* 1982, **116**, 21-9.
53. Ben Nathan, D., S. Lustig & H. D. Danenberg: Stress-induced neuroinvasiveness of a neurovirulent noninvasive Sindbis virus in cold or isolation subjected mice. *Life Sci* 1991, **48**, 1493-500.
54. Bennett Ao, M. R.: Stress and anxiety in schizophrenia and depression: glucocorticoids, corticotropin-releasing hormone and synapse regression. *Aust N Z J Psychiatry* 2008, **42**, 995-1002.
55. Benschop, H. P. & L. P. A. De Jong: Toxicokinetics of nerve agents. In: *Chemical Warfare Agents : Toxicity at Low Levels*. Eds.: S. M. Somani and J. A. Romano. CRC Press, 2001, pp. 25-81.
56. Bergmann, M. W., K. J. Staples, S. J. Smith, P. J. Barnes & R. Newton: Glucocorticoid inhibition of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor from T cells is independent of control by nuclear factor-kappaB and conserved lymphokine element 0. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004, **30**, 555-63.
57. Bernatova, I., M. Dubovicky, W. A. Price, R. D. Grubbs, J. B. Lucot & M. Morris: Effect of chronic pyridostigmine bromide treatment on cardiovascular and behavioral parameters in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2003, **74**, 901-7.
58. Bielajew, C., A. T. Konkle & Z. Merali: The effects of chronic mild stress on male Sprague-Dawley and Long Evans rats: I. Biochemical and physiological analyses. *Behav Brain Res* 2002, **136**, 583-92.
59. Bierhaus, A. & P. P. Nawroth: Modulation of the vascular endothelium during infection--the role of NF-kappa B activation. *Contrib Microbiol* 2003, **10**, 86-105.
60. Birtley, R. D., J. B. Roberts, B. H. Thomas & A. Wilson: Excretion and metabolism of [14C]-pyridostigmine in the rat. *Br J Pharmacol Chemother.* 1966, **26**, 393-402.
61. Blanchet, G., P. Carpentier & G. Lallement: Vulnérabilité du système nerveux central vis-à-vis des neurotoxiques organophosphorés. *Med Armées* 1991, **19**, 403-7.
62. Blanquet, P. R. & Y. Lamour: Brain-derived neurotrophic factor increases Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase 2 activity in hippocampus. *J Biol Chem* 1997, **272**, 24133-6.

63. Blanquet, P. R., J. Mariani & P. Derer: A calcium/calmodulin kinase pathway connects brain-derived neurotrophic factor to the cyclic AMP-responsive transcription factor in the rat hippocampus. *Neuroscience* 2003, **118**, 477-90.
64. Bockaert, J. & J. P. Pin: Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 1999, **18**, 1723-9.
65. Bottero, V., V. Imbert, C. Frelin, J. L. Formento & J. F. Peyron: Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. *Mol Diagn* 2003, **7**, 187-94.
66. Bowie, A. G. & I. R. Haga: The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 2005, **42**, 859-67.
67. Bowman, R. E., M. C. Zrull & V. N. Luine: Chronic restraint stress enhances radial arm maze performance in female rats. *Brain Res* 2001, **904**, 279-89.
68. Bowman, R. E., K. D. Beck & V. N. Luine: Chronic stress effects on memory: sex differences in performance and monoaminergic activity. *Horm Behav* 2003, **43**, 48-59.
69. Bramham, C. R. & E. Messaoudi: BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol* 2005, **76**, 99-125.
70. Breyer-Pfaff, U., U. Maier, A. M. Brinkmann & F. Schumm: Pyridostigmine kinetics in healthy subjects and patients with myasthenia gravis. *Clin Pharmacol Ther* 1985, **37**, 495-501.
71. Brower, V.: Gulf War syndrome revisited. *EMBO Rep* 2003, **4**, 551-3.
72. Brown, M.: Toxicological assessments of Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**, 649-79.
73. Buckingham, J. C.: Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. *Br J Pharmacol* 2006, **147**, S258-68.
74. Butt, A. E., G. Testylier & R. W. Dykes: Acetylcholine release in rat frontal and somatosensory cortex is enhanced during tactile discrimination learning. *Psychobiology* 1997, **25**, 18-33.
75. Cannon, W. B.: Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev.* 1929, **9**, 299-431.
76. Caulfield, M. P. & N. J. Birdsall: International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998, **50**, 279-90.
77. Chan, K. H. & S. L. Ho: An update on myasthenia gravis. *Hk Pract.* 2002, **22**, 8-20.
78. Chaney, L. A., R. W. Wineman, R. W. Rockhold & A. S. Hume: Acute effects of an insect repellent, N,N-diethyl-m-toluamide, on cholinesterase inhibition induced by pyridostigmine bromide in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000, **165**, 107-14.

79. Chen, Y. Z. & J. Qiu: Pleiotropic signaling pathways in rapid, nongenomic action of glucocorticoid. *Mol Cell Biol Res Commun* 1999, **2**, 145-9.
80. Chen, H., Y. Wu, Y. Zhang, L. Jin, L. Luo, B. Xue, C. Lu, X. Zhang & Z. Yin: Hsp70 inhibits lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation by interacting with TRAF6 and inhibiting its ubiquitination. *FEBS Lett* 2006, **580**, 3145-52.
81. Chen, J., T. Kitanishi, T. Ikeda, N. Matsuki & M. K. Yamada: Contextual learning induces an increase in the number of hippocampal CA1 neurons expressing high levels of BDNF. *Neurobiol Learn Mem* 2007, **88**, 409-15.
82. Cherry, N., F. Creed, A. Silman, G. Dunn, D. Baxter, J. Smedley, S. Taylor & G. J. Macfarlane: Health and exposures of United Kingdom Gulf war veterans. Part II: The relation of health to exposure. *Occup Environ Med* 2001, **58**, 299-306.
83. Cho, Y. H., K. P. Giese, H. Tanila, A. J. Silva & H. Eichenbaum: Abnormal hippocampal spatial representations in alphaCaMKII286A and CREBalphaDelta- mice. *Science* 1998, **279**, 867-9.
84. Cikos, S., A. Bukovska & J. Koppel: Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 2007, **8**, 113.
85. Coker, W. J., B. M. Bhatt, N. F. Blatchley & J. T. Graham: Clinical findings for the first 1000 Gulf war veterans in the Ministry of Defence's medical assessment programme. *Bmj*. 1999, **318**, 290-4.
86. Colbran, R. J.: Targeting of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem J* 2004, **378**, 1-16.
87. Colbran, R. J. & A. M. Brown: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 2004, **14**, 318-27.
88. Concato, J., M. Aslan, M. M. Palmisano, C. C. Doebbeling, P. Peduzzi, K. Ofek, H. Soreq & B. Doebbeling: Acetylcholinesterase activity in veterans of the first Gulf War. *J Investig Med* 2007, **55**, 360-7.
89. Conrad, C. D., S. J. Lupien & B. S. McEwen: Support for a bimodal role for type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 1999, **72**, 39-46.
90. Conte-Delvox, B., V. Guillaume, F. Boudouresque, N. Graziani, E. Magnan, M. Grino, N. Emperaire, K. Nahoul, M. Cataldi & C. Olivier: Effects of metyrapone infusion on corticotropin-releasing factor and arginine vasopressine secretion into the hypophysial portal blood of conscious, unrestrained rats. *Acta endocrinol.* 1992, **127**, 434-440.
91. Cook, J. E., M. A. Kolka & C. B. Wenger: Chronic pyridostigmine bromide administration: side effects among soldiers working in a desert environment. *Mil Med* 1992, **157**, 250-4.

92. Cook, M. R., M. M. Gerkovich, A. Sastre & C. Graham: Side effects of low-dose pyridostigmine bromide are not related to cholinesterase inhibition. *Aviat Space Environ Med* 2001, **72**, 1102-6.
93. Cook, M. R., C. Graham, A. Sastre & M. M. Gerkovich: Physiological and performance effects of pyridostigmine bromide in healthy volunteers: a dose-response study. *Psychopharmacology* 2002, **162**, 186-92.
94. Cordero, M. I., J. J. Merino & C. Sandi: Correlational relationship between shock intensity and corticosterone secretion on the establishment and subsequent expression of contextual fear conditioning. *Behav Neurosci* 1998, **112**, 885-91.
95. Costa, G. C.: Basic toxicology of pesticide. *Occupational medicine : state of the art. Review* 1997, **12**, 251-68.
96. Costa, L. G., T. B. Cole & C. E. Furlong: Polymorphisms of paraoxonase (PON1) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *J Toxicol Clin Toxicol* 2003, **41**, 37-45.
97. Cowan, D. N., R. F. DeFraités, G. C. Gray, M. B. Goldenbaum & S. M. Wishik: The risk of birth defects among children of Persian Gulf War veterans. *N Engl J Med* 1997, **336**, 1650-6.
98. Crawford, D. R., K. P. Leahy, N. Abramova, L. Lan, Y. Wang & K. J. Davies: Hamster adapt78 mRNA is a Down syndrome critical region homologue that is inducible by oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1997, **342**, 6-12.
99. Cronnelly, R., D. R. Stanski, R. D. Miller & L. B. Sheiner: Pyridostigmine kinetics with and without renal function. *Clin Pharmacol Ther* 1980, **28**, 78-81.
100. Cullinan, W. E., J. P. Herman, D. F. Battaglia, H. Akil & S. J. Watson: Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 1995, **64**, 477-505.
101. Cunningham, E. T., Jr. & E. B. De Souza: Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. *Immunol Today* 1993, **14**, 171-6.
102. Curtil, C. & P. Masson: Aging of cholinesterase after inhibition by organophosphates. *Ann Pharm Fr* 1993, **51**, 63-77.
103. D'Acquisto, F., M. J. May & S. Ghosh: Inhibition of nuclear factor kappa B (NF-B): an emerging theme in anti-inflammatory therapies. *Mol Interv* 2002, **2**, 22-35.
104. Dave, J., S. M. Anderson, G. A. Saviolakis, E. H. Mougey, R. A. Bauman & G. J. Kant: Chronic sustained stress increases levels of anterior pituitary prolactin mRNA. *Pharmacological Biochem Behav* 2000, **67**, 423-431.

105. David, A. S., L. Farrin, L. Hull, C. Unwin, S. Wessely & T. Wykes: Cognitive functioning and disturbances of mood in UK veterans of the Persian Gulf War: a comparative study. *Psychol Med* 2002, **32**, 1357-70.
106. De Bosscher, K., W. Vanden Berghe & G. Haegeman: The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev* 2003, **24**, 488-522.
107. De Kloet, E. R., E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl & M. Joels: Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998, **19**, 269-301.
108. de Kloet, E. R., M. S. Oitzl & M. Joels: Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 1999, **22**, 422-6.
109. de Kloet, E. R., M. Joels & F. Holsboer: Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005, **6**, 463-75.
110. de Kloet, E. R.: Commentary: neuroendocrine basis. *Prog Brain Res* 2008, **167**, 53-62.
111. de Quervain, D. J. & A. Papassotiropoulos: Identification of a genetic cluster influencing memory performance and hippocampal activity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, **103**, 4270-4.
112. Deak, T., K. A. Bordner, N. K. McElderry, C. J. Barnum, P. Blandino, Jr., M. M. Deak & S. P. Tammariello: Stress-induced increases in hypothalamic IL-1: a systematic analysis of multiple stressor paradigms. *Brain Res Bull* 2005, **64**, 541-56.
113. Deak, T.: From hippocampus to dorsal horn: the pervasive impact of IL-1 on learning and memory spans the length of the neuroaxis. *Brain Behav Immun*. 2007, **21**, 746-7.
114. DeBold, C. R., M. E. Schworer, T. B. Connor, R. E. Bird & D. N. Orth: Ectopic pro-opiomelanocortin: sequence of cDNA coding for beta-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin. *Science* 1983, **220**, 721-3.
115. Delhalle, S., R. Blasius, M. Dicato & M. Diederich: A beginner's guide to NF-kappaB signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* 2004, **1030**, 1-13.
116. Deocaris, C. C., S. C. Kaul & R. Wadhwa: On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60. *Cell Stress Chaperones* 2006, **11**, 116-28.
117. Depino, A. M., M. Alonso, C. Ferrari, A. del Rey, D. Anthony, H. Besedovsky, J. H. Medina & F. Pitossi: Learning modulation by endogenous hippocampal IL-1: blockade of endogenous IL-1 facilitates memory formation. *Hippocampus* 2004, **14**, 526-35.
118. Di, S., R. Malcher-Lopes, K. C. Halmos & J. G. Tasker: Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 2003, **23**, 4850-7.

119. Diamond, D. M., M. C. Bennett, M. Fleshner & G. M. Rose: Inverted-U relationship between the level of peripheral corticosterone and the magnitude of hippocampal primed burst potentiation. *Hippocampus* 1992, **2**, 421-30.
120. Dinarello, C. A.: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J* 1994, **8**, 1314-25.
121. Dinarello, C. A.: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996, **87**, 2095-147.
122. Diorio, D., V. Viau & M. J. Meaney: The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 1993, **13**, 3839-47.
123. Diserbo, M., A. Agin, I. Lamproglou, J. Mauris, F. Staali, E. Multon & C. Amourette: Blood-brain barrier permeability after gamma whole-body irradiation: an in vivo microdialysis study. *Can J Physiol Pharmacol* 2002, **80**, 670-8.
124. Doctor, B. P., D. M. Maxwell, Y. Ashani, A. Saxena & R. K. Gordon: New approaches to medical protection against chemical warfare nerve agents. In: *Chemical Warfare Agents : Toxicity at Low Levels*. Eds.: S. M. Somani and J. A. Romano. CRC Press, 2001, pp. 191-214.
125. Doebbeling, B. N., W. R. Clarke, D. Watson, J. C. Torner, R. F. Woolson, M. D. Voelker, D. H. Barrett & D. A. Schwartz: Is there a Persian Gulf War syndrome? Evidence from a large population-based survey of veterans and nondeployed controls. *Am J Med* 2000, **108**, 695-704.
126. Domingo, J. L.: Reproductive and developmental toxicity of natural and depleted uranium: a review. *Reprod Toxicol* 2001, **15**, 603-9.
127. Doyle, P., N. Maconochie & M. Ryan: Reproductive health of Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**, 571-84.
128. Drachman, D. B.: Myasthenia gravis. *N Engl J Med* 1994, **330**, 1797-810.
129. Drake, C. T., T. A. Milner & S. L. Patterson: Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J Neurosci* 1999, **19**, 8009-26.
130. Dunn, M. A., B. Hackley & F. R. Sidell: Pretreatment for nerve agent exposure. In: *Textbook of military medicine : medical aspects of chemical and biological warfare agent*. Eds.: F. R. Sidell, E. T. Takafuji and D. R. Franz. Walter Reed Army Medical Center, Washington, 1997, pp. 181-96.
131. Dunn, M. A. & F. R. Sidell: Progress in medical defense against nerve agents. *Jama* 1989, **262**, 649-52.
132. Ehrlich, G., D. Ginzberg, Y. Loewenstein, D. Glick, B. Kerem, S. Ben-Ari, H. Zakut & H. Soreq: Population diversity and distinct haplotype frequencies associated with ACHE and

- BCHE genes of Israeli Jews from trans-Caucasian Georgia and from Europe. *Genomics* 1994, **22**, 288-95.
133. Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres & R. M. Feather-Stone: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961, **7**, 88-95.
134. Engel, A. G.: Myasthenia gravis and myasthenic syndromes. *Ann Neurol* 1984, **16**, 519-34.
135. Engelmann, M., R. Landgraf & C. T. Wotjak: The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol* 2004, **25**, 132-49.
136. Ermak, G., T. E. Morgan & K. J. Davies: Chronic overexpression of the calcineurin inhibitory gene DSCR1 (Adapt78) is associated with Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2001, **276**, 38787-94.
137. Escalante, A. & M. Fischbach: Musculoskeletal manifestations, pain, and quality of life in Persian Gulf War veterans. Part II : the relation of health to exposure. *Occup Environ Med* 2001, **58**, 299-306.
138. Falkenstein, E., A. W. Norman & M. Wehling: Mannheim classification of nongenomically initiated (rapid) steroid action(s). *J Clin Endocrinol Metab* 2000, **85**, 2072-5.
139. Feder, M. E. & G. E. Hofmann: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 1999, **61**, 243-82.
140. Felder, C. C.: Muscarinic acetylcholine receptors: signal transduction through multiple effectors. *Faseb J* 1995, **9**, 619-25.
141. Feldker, D. E., M. C. Morsink, A. H. Veenema, N. A. Datson, V. Proutski, D. Lathouwers, E. R. de Kloet & E. Vreugdenhil: The effect of chronic exposure to highly aggressive mice on hippocampal gene expression of non-aggressive subordinates. *Brain Res* 2006, **1089**, 10-20.
142. Ferguson, D. & R. Sapolsky: Mineralocorticoid receptor overexpression differentially modulates specific phases of spatial and nonspatial memory. *J Neurosci* 2007, **27**, 8046-52.
143. Finkbeiner, S.: Calcium regulation of the brain-derived neurotrophic factor gene. *Cell Mol Life Sci* 2000, **57**, 394-401.
144. Focking, M., I. Holker & T. Trapp: Chronic glucocorticoid receptor activation impairs CREB transcriptional activity in clonal neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **304**, 720-3.
145. Forman-Hoffman, V. L., P. M. Peloso, D. W. Black, R. F. Woolson, E. M. Letuchy & B. N. Doebbeling: Chronic Widespread Pain in Veterans of the First Gulf War: Impact of Deployment Status and Associated Health Effects. *J Pain* 2007, **8**, 954-61.

146. Forster, E. M., J. A. Barber, F. R. Parker, Jr., J. E. Whinnery, R. R. Burton & P. Boll: Effect of pyridostigmine bromide on acceleration tolerance and performance. *Aviat Space Environ Med* 1994, **65**, 110-6.
147. Fossier, P., B. Poulain, G. Baux & L. Tauc: Both presynaptic nicotinic-like and muscarinic-like autoreceptors regulate acetylcholine release at an identified neuro-neuronal synapse of *Aplysia*. *Pflugers Arch* 1988, **411**, 345-52.
148. Friedman, A., D. Kaufer, J. Shemer, I. Hendler, H. Soreq & I. Tur-Kaspa: Pyridostigmine brain penetration under stress enhances neuronal excitability and induces early immediate transcriptional response. *Nat Med* 1996, **2**, 1382-5.
149. Fukuda, K., R. Nisenbaum, G. Stewart, W. W. Thompson, L. Robin, R. M. Washko, D. L. Noah, D. H. Barrett, B. Randall, B. L. Herwaldt, A. C. Mawle & W. C. Reeves: Chronic multisymptom illness affecting Air Force veterans of the Gulf War. *Jama*. 1998, **280**, 981-8.
150. Fukudo, S., K. Abe, M. Hongo, A. Utsumi & Y. Itoyama: Psychophysiological stress induces heat shock cognate protein (HSC) 70 mRNA in the cerebral cortex and stomach of rats. *Brain Res* 1995, **675**, 98-102.
151. Fukudo, S., K. Abe, M. Hongo, A. Utsumi & Y. Itoyama: Brain-gut induction of heat shock protein (HSP) 70 mRNA by psychophysiological stress in rats. *Brain Res* 1997, **757**, 146-8.
152. Galzi, J. L. & J. P. Changeux: Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 1995, **34**, 563-82.
153. Garcia-Bueno, B., J. R. Caso & J. C. Leza: Stress as a neuroinflammatory condition in brain: damaging and protective mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev* 2008, **32**, 1136-51.
154. Gemma, C., L. Imeri & M. R. Opp: Serotonergic activation stimulates the pituitary-adrenal axis and alters interleukin-1 mRNA expression in rat brain. *Psychoneuroendocrinology* 2003, **28**, 875-84.
155. Gentry, M. & N. Bitsko: Pyridostigmine inhibition of acetylcholinesterase and phenotyping of butyrylcholinesterase : a comparison in Gulf War Veterans and normal controls. *CB Medical Treatment Symposium* 1996, **Switzerland**.
156. Gerlach, J. L. & B. S. McEwen: Rat brain binds adrenal steroid hormone: radioautography of hippocampus with corticosterone. *Science* 1972, **175**, 1133-6.
157. Gibertini, M., C. Newton, H. Friedman & T. W. Klein: Spatial learning impairment in mice infected with *Legionella pneumophila* or administered exogenous interleukin-1-beta. *Brain Behav Immun* 1995, **9**, 113-28.
158. Giese, K. P., N. B. Fedorov, R. K. Filipkowski & A. J. Silva: Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science*. 1998, **279**, 870-3.

159. Giraldo, E., R. Hammer & H. Ladinsky: Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain as determined in binding studies with AF-DX 116 and pirenzepine. *Life Sci* 1987, **40**, 833-40.
160. Givalois, L., S. Arancibia, G. Alonso & L. Tapia-Arancibia: Expression of brain-derived neurotrophic factor and its receptors in the median eminence cells with sensitivity to stress. *Endocrinology* 2004, **145**, 4737-47.
161. Gomez-Pinilla, F., J. R. Huie, Z. Ying, A. R. Ferguson, E. D. Crown, K. M. Baumbauer, V. R. Edgerton & J. W. Grau: BDNF and learning: Evidence that instrumental training promotes learning within the spinal cord by up-regulating BDNF expression. *Neuroscience* 2007, **148**, 893-906.
162. Goshen, I., A. Avital, R. Canaan, E. Shohami, K. Iverfeldt, G. Richter-Levin & R. Yirmiya: Impaired Interleukin-1 (IL-1) signaling is associated with memory impairments. *Neuroscience letters* 2000, **55**, S22.
163. Goshen, I., A. Avital, M. Segal, Richter-Levin & R. Yirmiya: IL-1 receptor knockout mice display impairments in hippocampal plasticity and memory functions. *Brain Behav Immun* 2001, **15**, 152.
164. Goshen, I., R. Yirmiya, K. Iverfeldt & J. Weidenfeld: The role of endogenous interleukin-1 in stress-induced adrenal activation and adrenalectomy-induced adrenocorticotrophic hormone hypersecretion. *Endocrinology* 2003, **144**, 4453-8.
165. Goshen, I., T. Kreisel, H. Ounallah-Saad, P. Renbaum, Y. Zalstein, T. Ben-Hur, E. Levy-Lahad & R. Yirmiya: A dual role for interleukin-1 in hippocampal-dependent memory processes. *Psychoneuroendocrinology*. 2007, **32**, 1106-15.
166. Goshen, I. & R. Yirmiya: Interleukin-1 (IL-1): A central regulator of stress responses. *Front Neuroendocrinol* 2008, **30**, 30-45.
167. Goujon, E., P. Parnet, S. Laye, C. Combe, K. W. Kelley & R. Dantzer: Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. *Brain Behav Immun* 1995, **9**, 292-303.
168. Goulon-Goëan, C. & P. Gajdos: Myasthénie et syndrome myasthénique. *Encycl Med Chir* 2002, **17**, 172 B10 : 14P.
169. Grauer, E., D. Alkalai, J. Kapon, G. Cohen & L. Raveh: Stress does not enable pyridostigmine to inhibit brain cholinesterase after parenteral administration. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000, **164**, 301-4.
170. Gray, G. C. & H. K. Kang: Healthcare utilization and mortality among veterans of the Gulf War. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**, 553-69.

171. Gunderson, C. H., C. R. Lehmann, F. R. Sidell & B. Jabbari: Nerve agents: a review. *Neurology* 1992, **42**, 946-50.
172. Gylys, K. H. & D. J. Jenden: Regulation of acetylcholine synthesis in the presence of hemicholinium mustard. *Life Sci* 1996, **58**, 1937-46.
173. Haley, R. W.: Is Gulf War syndrome due to stress? The evidence reexamined. *Am J Epidemiol.* 1997, **146**, 695-703.
174. Haley, R. W. & T. L. Kurt: Self-reported exposure to neurotoxic chemical combinations in the Gulf War. A cross-sectional epidemiologic study. *Jama.* 1997, **277**, 231-7.
175. Haley, R. W., S. Billecke & B. N. La Du: Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999, **157**, 227-33.
176. Haley, R. W.: Excess incidence of ALS in young Gulf War veterans. *Neurology* 2003, **61**, 750-6.
177. Han, F., H. Ozawa, K. Matsuda, M. Nishi & M. Kawata: Colocalization of mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor in the hippocampus and hypothalamus. *Neurosci Res* 2005, **51**, 371-81.
178. Hanin, I.: The Gulf War, stress and a leaky blood-brain barrier. *Nat Med.* 1996, **2**, 1307-8.
179. Hanson, P. I., T. Meyer, L. Stryer & H. Schulman: Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron* 1994, **12**, 943-56.
180. Hansson, A. C., A. Cintra, N. Belluardo, W. Sommer, M. Bhatnagar, M. Bader, D. Ganten & K. Fuxe: Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 2000, **12**, 2918-34.
181. Hashimoto, R., Y. Moriguchi, F. Yamashita, T. Mori, K. Nemoto, T. Okada, H. Hori, H. Noguchi, H. Kunugi & T. Ohnishi: Dose-dependent effect of the Val66Met polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene on memory-related hippocampal activity. *Neurosci Res* 2008, **61**, 360-367.
182. Hassert, D. L., T. Miyashita & C. L. Williams: The effects of peripheral vagal nerve stimulation at a memory-modulating intensity on norepinephrine output in the basolateral amygdala. *Behav Neurosci* 2004, **118**, 79-88.
183. Heck, S., K. Bender, M. Kullmann, M. Gottlicher, P. Herrlich & A. C. Cato: I kappaB alpha-independent downregulation of NF-kappaB activity by glucocorticoid receptor. *Embo J* 1997, **16**, 4698-707.

184. Herman, J. P., P. D. Patel, H. Akil & S. J. Watson: Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol Endocrinol* 1989, **3**, 1886-94.
185. Herrera, D. G. & H. A. Robertson: Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 1996, **50**, 83-107.
186. Heumann, R.: Neurotrophin signalling. *Curr Opin Neurobiol* 1994, **4**, 668-79.
187. Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh & R. Griffith: Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992, **10**, 413-7.
188. Hinz, B. & R. Hirschelmann: Rapid non-genomic feedback effects of glucocorticoids on CRF-induced ACTH secretion in rats. *Pharm Res* 2000, **17**, 1273-7.
189. Hood, L. J.: Myasthenia gravis: regimens and regimen-associated problems in adults. *J Neurosci Nurs* 1990, **22**, 358-64.
190. Horner, R. D., K. G. Kamins, J. R. Feussner, S. C. Grambow, J. Hoff-Lindquist, Y. Harati, H. Mitsumoto, R. Pascuzzi, P. S. Spencer, R. Tim, D. Howard, T. C. Smith, M. A. Ryan, C. J. Coffman & E. J. Kasarskis: Occurrence of amyotrophic lateral sclerosis among Gulf War veterans. *Neurology*. 2003, **61**, 742-9.
191. Hotopf, M., A. David, L. Hull, K. Ismail, C. Unwin & S. Wessely: Role of vaccinations as risk factors for ill health in veterans of the Gulf war: cross sectional study. *Bmj* 2000, **320**, 1363-7.
192. Hotopf, M., M. I. Mackness, V. Nikolaou, D. A. Collier, C. Curtis, A. David, P. Durrington, L. Hull, K. Ismail, M. Peakman, C. Unwin, S. Wessely & B. Mackness: Paraoxonase in Persian Gulf War veterans. *J Occup Environ Med* 2003, **45**, 668-75.
193. Huang, L., N. F. Mivechi & D. Moskophidis: Insights into regulation and function of the major stress-induced hsp70 molecular chaperone in vivo: analysis of mice with targeted gene disruption of the hsp70.1 or hsp70.3 gene. *Mol Cell Biol* 2001, **21**, 8575-91.
194. Hudmon, A. & H. Schulman: Neuronal CA2+/calmodulin-dependent protein kinase II: the role of structure and autoregulation in cellular function. *Annu Rev Biochem* 2002, **71**, 473-510.
195. Hughes, P. & M. Dragunow: Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacol Rev* 1995, **47**, 133-78.
196. Husain, M. A., J. B. Roberts, B. H. Thomas & A. Wilson: The excretion and metabolism of oral <sup>14</sup>C-pyridostigmine in the rat. *Br J Pharmacol* 1968, **34**, 445-50.
197. Ing, N. H.: Steroid hormones regulate gene expression posttranscriptionally by altering the stabilities of messenger RNAs. *Biol Reprod* 2005, **72**, 1290-6.

198. Inoue, T., K. Tsuchiya & T. Koyama: Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1994, **49**, 911-20.
199. Irvine, E. E., L. S. von Hertzen, F. Plattner & K. P. Giese: alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci* 2006, **29**, 459-65.
200. Ishoy, T., A. M. Andersson, P. Suadicani, B. Guldager, M. Appleyard, F. Gyntelberg & N. E. Skakkebaek: Major reproductive health characteristics in male Gulf War Veterans. The Danish Gulf War Study. *Dan Med Bull* 2001, **48**, 29-32.
201. Ismail, K., B. Everitt, N. Blatchley, L. Hull, C. Unwin, A. David & S. Wessely: Is there a Gulf War syndrome?. *Lancet* 1999, **353**, 179-82.
202. Isosaki, M. & T. Nakashima: Psychological stress induces heat shock protein 70 expression in rat aorta. *Jpn J Pharmacol* 1998, **76**, 305-8.
203. Ito, C. Y., A. G. Kazantsev & A. S. Baldwin, Jr.: Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res* 1994, **22**, 3787-92.
204. Izraeli, S., D. Avgar, S. Almog, I. Shochat, Z. Tochner, A. Tamir & J. Ribak: The effect of repeated doses of 30 mg pyridostigmine bromide on pilot performance in an A-4 flight simulator. *Aviat Space Environ Med* 1990, **61**, 430-2.
205. Jacobson, L.: Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005, **34**, 271-92.
206. Joels, M., H. Karst, H. J. Krugers & P. J. Lucassen: Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol* 2007, **28**, 72-96.
207. Joels, M., H. Karst, R. DeRijk & E. R. de Kloet: The coming out of the brain mineralocorticoid receptor. *Trends Neurosci* 2008, **31**, 1-7.
208. Jones, P. G. & J. Dunlop: Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. *Neuropharmacology* 2007, **53**, 197-206.
209. Kagawa, N. & Y. Mugiya: Brain HSP70 mRNA expression is linked with plasma cortisol levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a potential predator. *Zoolog Sci* 2002, **19**, 735-40.
210. Kang, H. K. & T. A. Bullman: Mortality among US veterans of the Persian Gulf War: 7-year follow-up. *Am J Epidemiol* 2001, **154**, 399-405.
211. Kang, H. K., C. M. Mahan, K. Y. Lee, F. M. Murphy, S. J. Simmens, H. A. Young & P. H. Levine: Evidence for a deployment-related Gulf War syndrome by factor analysis. *Arch Environ Health*. 2002, **57**, 61-8.

212. Kant, G. J., R. A. Bauman, S. R. Feaster, S. M. Anderson, G. A. Saviolakis & G. E. Garcia: The combined effects of pyridostigmine and chronic stress on brain cortical and blood acetylcholinesterase, corticosterone, prolactin and alternation performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2001, **70**, 209-18.
213. Kaplan, D. R. & F. D. Miller: Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 2000, **10**, 381-91.
214. Katz, B. & R. Miledi: The timing of calcium action during neuromuscular transmission. *J Physiol* 1967, **189**, 535-44.
215. Kaufer, D., A. Friedman, S. Seidman & H. Soreq: Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature.* 1998, **393**, 373-7.
216. Keeler, J. R., C. G. Hurst & M. A. Dunn: Pyridostigmine used as a nerve agent pretreatment under wartime conditions. *Jama.* 1991, **266**, 693-5.
217. Keifer, M. C. & R. K. Mahurin: Chronic neurologic effects of pesticide overexposure. *Occupational medicine : state of the art. Review* 1997, **12**, 291-304.
218. Kelsall, H. L., M. R. Sim, A. B. Forbes, D. C. Glass, D. P. McKenzie, J. F. Ikin, M. J. Abramson, L. Blizzard & P. Ittak: Symptoms and medical conditions in Australian veterans of the 1991 Gulf War: relation to immunisations and other Gulf War exposures. *Occup Environ Med.* 2004, **61**, 1006-13.
219. Kelsall, H., R. Macdonell, M. Sim, A. Forbes, D. McKenzie, D. Glass, J. Ikin & P. Ittak: Neurological status of Australian veterans of the 1991 Gulf War and the effect of medical and chemical exposures. *Int J Epidemiol.* 2005, **34**, 810-9.
220. Kelsall, H. L., M. R. Sim, J. F. Ikin, A. B. Forbes, D. P. McKenzie, D. C. Glass & P. Ittak: Reproductive health of male Australian veterans of the 1991 Gulf War. *BMC Public Health.* 2007, **7**, 79.
221. Kesner, R. P.: Behavioral functions of the CA3 subregion of the hippocampus. *Learn Mem* 2007, **14**, 771-81.
222. Kiang, J. G. & G. C. Tsokos: Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 1998, **80**, 183-201.
223. Kim, J. J. & D. M. Diamond: The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nat Rev Neurosci* 2002, **3**, 453-62.
224. Kim, J. J. & K. S. Yoon: Stress: metaplastic effects in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1998, **21**, 505-9.
225. Kipen, H. M., W. Hallman, H. Kang, N. Fiedler & B. H. Natelson: Prevalence of chronic fatigue and chemical sensitivities in Gulf Registry Veterans. *Arch Environ Health* 1999, **54**, 313-8.

226. Kluwe, W. M.: Efficacy of pyridostigmine against soman intoxication in a primate model. In: *Proceedings of the 6th medical chemical defense bioscience review*. US Army medical research institute of chemical defense, Aberdeen Proving Ground, 1987, pp. 227-34.
227. Knoke, J. D., T. C. Smith, G. C. Gray, K. S. Kaiser & A. W. Hawksworth: Factor analysis of self-reported symptoms: does it identify a Gulf War syndrome? *Am J Epidemiol* 2000, **152**, 379-88.
228. Knudsen, P. J., C. A. Dinarello & T. B. Strom: Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J Immunol* 1987, **139**, 4129-34.
229. Kolarow, R., T. Brigadski & V. Lessmann: Postsynaptic secretion of BDNF and NT-3 from hippocampal neurons depends on calcium calmodulin kinase II signaling and proceeds via delayed fusion pore opening. *J Neurosci* 2007, **27**, 10350-64.
230. Kolber, B. J., L. Wieczorek & L. J. Muglia: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and behavioral analysis of mouse mutants with altered glucocorticoid or mineralocorticoid receptor function. *Stress* 2008, **11**, 321-38.
231. Koplovitz, I., L. W. Harris, D. R. Anderson, W. J. Lennox & J. R. Stewart: Reduction by pyridostigmine pretreatment of the efficacy of atropine and 2-PAM treatment of sarin and VX poisoning in rodents. *Fundam Appl Toxicol* 1992, **18**, 102-6.
232. Koponen, E., M. Lakso, E. Castren, V. Voikar, R. Riekkilä, T. Saarelainen, T. Rauramaa, H. Rauvala, T. Taira, S. Lahtinen & A. Pitkanen: Overexpression of the full-length neurotrophin receptor trkB regulates the expression of plasticity-related genes in mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 2004, **130**, 81-94.
233. Kornfeld, P., A. J. Samuels, R. L. Wolf & K. E. Osserman: Metabolism of <sup>14</sup>C-labeled pyridostigmine in myasthenia gravis. Evidence for multiple metabolites. *Neurology* 1970, **20**, 634-41.
234. Kregel, K. C.: Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* 2002, **92**, 2177-86.
235. Kubik, S., T. Miyashita & J. F. Guzowski: Using immediate-early genes to map hippocampal subregional functions. *Learn Mem* 2007, **14**, 758-70.
236. Lallement, G.: Heat stress, even extreme, does not induce penetration of pyridostigmine into the brain of guinea pigs. *Neurotoxicology* 1998, **19**, 759-766.
237. Lamproglou, I., L. Barbier, M. Diserbo, F. Fauvelle, W. Fauquette & C. Amourette: Repeated stress in combination with pyridostigmine Part I: Long-term behavioural consequences. *Behav Brain Res* 2009, **197**, 301-310.

238. Lancaster, G. I. & M. A. Febbraio: Exosome-dependent trafficking of HSP70: a novel secretory pathway for cellular stress proteins. *J Biol Chem* 2005, **280**, 23349-55.
239. Landrigan, P. J.: Illness in Gulf War veterans. Causes and consequences. *Jama*. 1997, **277**, 259-61.
240. Larويا, G., R. Cuesta, G. Brewer & R. J. Schneider: Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 1999, **284**, 499-502.
241. Layish, I., A. Krivoy, E. Rotman, A. Finkelstein, Z. Tashma & Y. Yehezkelli: Pharmacologic prophylaxis against nerve agent poisoning. *Isr Med Assoc J* 2005, **7**, 182-7.
242. Le Poncin-Lafitte, M., J. C. Lafitte & J. R. Rapin: Sound-Avoidance conditioning and a mathematical approach to the description of acquisition performance. *Mathematical biosciences* 1982, **59**, 249-268.
243. Lee, B. H., T. C. Stelly, W. J. Colucci, J. G. Garcia, R. D. Gandour & D. M. Quinn: Inhibition of acetylcholinesterase by hemicholiniums, conformationally constrained choline analogues. Evaluation of aryl and alkyl substituents. Comparisons with choline and (3-hydroxyphenyl)trimethylammonium. *Chem Res Toxicol* 1992, **5**, 411-8.
244. Lee, K. H., C. T. Lee, Y. W. Kim, S. K. Han, Y. S. Shim & C. G. Yoo: Heat shock protein 70 negatively regulates the heat-shock-induced suppression of the IkappaB/NF-kappaB cascade by facilitating IkappaB kinase renaturation and blocking its further denaturation. *Exp Cell Res* 2005, **307**, 276-84.
245. Lee, S. W., A. P. Tsou, H. Chan, J. Thomas, K. Petrie, E. M. Eugui & A. C. Allison: Glucocorticoids selectively inhibit the transcription of the interleukin 1 beta gene and decrease the stability of interleukin 1 beta mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, **85**, 1204-8.
246. Leggett, R. W.: The behavior and chemical toxicity of U in the kidney: a reassessment. *Health Phys* 1989, **57**, 365-83.
247. Lehmann, T., C. Murphy, D. G. Zahra & M. L. Handel: Reduction of tumor necrosis factor induced nuclear factor-kappaB nuclear translocation and DNA binding by dexamethasone in human osteoarthritic synovial tissue explants. *J Rheumatol* 2002, **29**, 787-95.
248. Leibrock, J., F. Lottspeich, A. Hohn, M. Hofer, B. Hengerer, P. Masiakowski, H. Thoenen & Y. A. Barde: Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* 1989, **341**, 149-52.
249. Lessmann, V., K. Gottmann & M. Malcangio: Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol* 2003, **69**, 341-74.

250. Lever, I. J., E. J. Bradbury, J. R. Cunningham, D. W. Adelson, M. G. Jones, S. B. McMahon, J. C. Marvizon & M. Malcangio: Brain-derived neurotrophic factor is released in the dorsal horn by distinctive patterns of afferent fiber stimulation. *J Neurosci* 2001, **21**, 4469-77.
251. Lew, W., J. J. Oppenheim & K. Matsushima: Analysis of the suppression of IL-1 alpha and IL-1 beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. *J Immunol* 1988, **140**, 1895-902.
252. Li, Q., F. Pan, X. Y. Chen, H. Jiang, H. J. Zhang, H. L. Yu & C. Y. Lu: HSP70 expression in the hippocampal CA3 subfield in different chronic stress models. *Chin J Physiol* 2006, **49**, 119-25.
253. Li, X. H., N. B. Liu, M. H. Zhang, Y. L. Zhou, J. W. Liao, X. Q. Liu & H. W. Chen: Effects of chronic multiple stress on learning and memory and the expression of Fyn, BDNF, TrkB in the hippocampus of rats. *Chin Med J (Engl)*. 2007, **120**, 669-74.
254. Liberman, A. C., J. Druker, M. J. Perone & E. Arzt: Glucocorticoids in the regulation of transcription factors that control cytokine synthesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, **18**, 45-56.
255. Lillie, R. D. & H. M. Fullmer: Histopathologic technique and practice. New York : McGraw-Hill, 1976, pp. 208-209.
256. Link, H., G. Dayanithi, K. J. Fohr & M. Gratzl: Oxytocin at physiological concentrations evokes adrenocorticotropin (ACTH) release from corticotrophs by increasing intracellular free calcium mobilized mainly from intracellular stores. Oxytocin displays synergistic or additive effects on ACTH-releasing factor or arginine vasopressin-induced ACTH secretion, respectively. *Endocrinology* 1992, **130**, 2183-91.
257. Linnarsson, S., A. Bjorklund & P. Ernfors: Learning deficit in BDNF mutant mice. *Eur J Neurosci* 1997, **9**, 2581-7.
258. Lisman, J., H. Schulman & H. Cline: The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci* 2002, **3**, 175-90.
259. Liu, J. H., K. Muse, P. Contreras, D. Gibbs, W. Vale, J. Rivier & S. S. Yen: Augmentation of ACTH-releasing activity of synthetic corticotropin releasing factor (CRF) by vasopressin in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, **57**, 1087-9.
260. Liu, N. B., H. Li, X. Q. Liu, C. Y. Sun, S. R. Cheng, M. H. Zhang, S. C. Liu & W. X. Wang: Chronic multiple stress enhances learning and memory capability in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2004, **56**, 615-9.
261. Livak, K. J. & T. D. Schmittgen: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001, **25**, 402-8.

262. Lo Sauro, C., C. Ravaldi, P. L. Cabras, C. Faravelli & V. Ricca: Stress, hypothalamic-pituitary-adrenal axis and eating disorders. *Neuropsychobiology* 2008, **57**, 95-115.
263. Loddick, S. A., C. Liu, T. Takao, K. Hashimoto & E. B. De Souza: Interleukin-1 receptors: cloning studies and role in central nervous system disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 1998, **26**, 306-19.
264. Loewenstein Lichtenstein, Y., M. Schwarz, D. Glick, B. Norgaard Pedersen, H. Zakut & H. Soreq: Genetic predisposition to adverse consequences of anti-cholinesterases in 'atypical' BCHE carriers. *Nat Med* 1995, **1**, 1082-5.
265. Lu, B.: BDNF and activity-dependent synaptic modulation. *Learn Mem* 2003, **10**, 86-98.
266. Lu, Y., K. Christian & B. Lu: BDNF: a key regulator for protein synthesis-dependent LTP and long-term memory? *Neurobiol Learn Mem* 2008, **89**, 312-23.
267. Lucas, K. E., P. C. Rowe & H. K. Armenian: Latency and exposure-health associations in Gulf War veterans with early fatigue onsets: a case-control study. *Ann Epidemiol* 2007, **17**, 799-806.
268. Luine, V., C. Martinez, M. Villegas, A. M. Magarinos & B. S. McEwen: Restraint stress reversibly enhances spatial memory performance. *Physiol Behav* 1996, **59**, 27-32.
269. Luine, V. N.: Steroid Hormone Modulation of Hippocampal Dependent Spatial Memory. *Stress* 1997, **2**, 21-36.
270. Lupien, S. J. & B. S. McEwen: The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Brain Res Rev* 1997, **24**, 1-27.
271. Maconochie, N., P. Doyle & C. Carson: Infertility among male UK veterans of the 1990-1 Gulf war: reproductive cohort study. *Bmj* 2004, **329**, 196-201.
272. Madrigal, J. L., O. Hurtado, M. A. Moro, I. Lizasoain, P. Lorenzo, A. Castrillo, L. Bosca & J. C. Leza: The increase in TNF-alpha levels is implicated in NF-kappaB activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology* 2002, **26**, 155-63.
273. Madsen, J. M., C. G. Hurst, R. MacIntosh & J. A. Romano: Clinical considerations in the use of Pyridostigmine Bromide as pretreatment for nerve-agent exposure. *army medical research institute of chemical defense* 2003.
274. Makara, G. B. & J. Haller: Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 2001, **65**, 367-90.
275. Marin, M. T., F. C. Cruz & C. S. Planeta: Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav* 2007, **90**, 29-35.

276. Marino, M. T., B. G. Schuster, R. P. Brueckner, E. Lin, A. Kaminskis & K. C. Lasseter: Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pyridostigmine bromide for prophylaxis against nerve agents in humans. *J Clin Pharmacol* 1998, **38**, 227-35.
277. Maroni, P., P. Bendinelli, L. Tiberio, F. Rovetta, R. Piccoletti & L. Schiaffonati: In vivo heat-shock response in the brain: signalling pathway and transcription factor activation. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003, **119**, 90-9.
278. Marrosu, F., C. Portas, M. S. Mascia, M. A. Casu, M. Fa, M. Giagheddu, A. Imperato & G. L. Gessa: Microdialysis measurement of cortical and hippocampal acetylcholine release during sleep-wake cycle in freely moving cats. *Brain Res* 1995, **671**, 329-32.
279. Marrs, T. C.: Toxicology of organophosphate nerve agents. In: *Chemical Warfare Agents : Toxicology and Treatment*. Eds.: T. C. Marrs, R. L. Maynard and F. R. Sidell. John Wiley and Sons, 2007, pp. 191-221.
280. Marshall, A. C.: Gulf war depleted uranium risks. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2008, **18**, 95-108.
281. McCulloch, C. A., G. P. Downey & H. El-Gabalawy: Signalling platforms that modulate the inflammatory response: new targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2006, **5**, 864-76.
282. McEvoy, G.: Drug information. In: *American society of hospital pharmacists*. Ed.: AHFS, Bethesda, 1991.
283. McEwen, B., D. Albeck, H. Cameron, H. M. Chao, E. Gould, N. Hastings, Y. Kuroda, V. Luine, A. M. Magarinos & C. R. McKittrick: Stress and the brain : a paradoxical role for adrenal steroids. *Vitam Horm* 1995, **51**, 371-402.
284. McEwen, B. S.: Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci* 1998, **840**, 33-44.
285. McEwen, B. S.: The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*. 2000, **886**, 172-189.
286. McEwen, B. S.: Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism* 2008, **57**, S11-5.
287. Meijer, O. C., E. C. de Lange, D. D. Breimer, A. G. de Boer, J. O. Workel & E. R. de Kloet: Penetration of dexamethasone into brain glucocorticoid targets is enhanced in mdr1A P-glycoprotein knockout mice. *Endocrinology* 1998, **139**, 1789-93.
288. Meyer, H. G., B. J. Lukey, R. T. Gepp, R. P. Corpuz & C. N. Lieske: A radioimmunoassay for pyridostigmine. *J Pharmacol Exp Ther* 1988, **247**, 432-8.
289. Miller, R. L. & P. Verma: Radioimmunoassay of pyridostigmine in plasma and tissues. *Pharmacol Res* 1989, **21**, 359-68.

290. Miller, A. C., W. F. Blakely, D. Livengood, T. Whittaker, J. Xu, J. W. Ejniak, M. M. Hamilton, E. Parlette, T. S. John, H. M. Gerstenberg & H. Hsu: Transformation of human osteoblast cells to the tumorigenic phenotype by depleted uranium-uranyl chloride. *Environ Health Perspect* 1998, **106**, 465-71.
291. Miller, A. C., K. Brooks, M. Stewart, B. Anderson, L. Shi, D. McClain & N. Page: Genomic instability in human osteoblast cells after exposure to depleted uranium: delayed lethality and micronuclei formation. *J Environ Radioact* 2003, **64**, 247-59.
292. Minichiello, L., A. M. Calella, D. L. Medina, T. Bonhoeffer, R. Klein & M. Korte: Mechanism of TrkB-mediated hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 2002, **36**, 121-37.
293. Mizoguchi, K., A. Ishige, M. Aburada & T. Tabira: Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*. 2003, **119**, 887-97.
294. Mizuno, M., K. Yamada, J. He, A. Nakajima & T. Nabeshima: Involvement of BDNF receptor TrkB in spatial memory formation. *Learn Mem* 2003, **10**, 108-15.
295. Moldow, R. L., K. D. Beck, S. Weaver & R. J. Servatius: Blockage of glucocorticoid, but not mineralocorticoid receptors prevents the persistent increase in circulating basal corticosterone concentrations following stress in the rat. *Neurosci Lett* 2005, **374**, 25-8.
296. Morimoto, R. I., P. E. Kroeger & J. J. Cotto: The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *Exs* 1996, **77**, 139-63.
297. Morris, R. G., P. Garrud, J. N. Rawlins & J. O'Keefe: Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982, **297**, 681-3.
298. Moser, E., M. B. Moser & P. Andersen: Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 1993, **13**, 3916-25.
299. Mu, J. S., W. P. Li, Z. B. Yao & X. F. Zhou: Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 1999, **835**, 259-65.
300. Mukherji, S. & T. R. Soderling: Regulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by inter- and intrasubunit-catalyzed autophosphorylations. *J Biol Chem* 1994, **269**, 13744-7.
301. Mullis, K., F. Faloona, S. Scharf, R. Sakai, G. Horn & H. Erlich: Specific enzymatic amplification of DNA in vitro : the Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 1986, **L1**, 263-73.

302. Murphy, F. M., H. Kang, N. A. Dalager, K. Y. Lee, R. E. Allen, S. H. Mather & K. W. Kizer: The health status of Gulf War veterans: lessons learned from the Department of Veterans Affairs Health Registry. *Mil Med.* 1999, **164**, 327-31.
303. Nakai, A., M. Tanabe, Y. Kawazoe, J. Inazawa, R. I. Morimoto & K. Nagata: HSF4, a new member of the human heat shock factor family which lacks properties of a transcriptional activator. *Mol Cell Biol* 1997, **17**, 469-81.
304. Neville, L. F., A. Gnatt, Y. Loewenstein, S. Seidman, G. Ehrlich & H. Soreq: Intramolecular relationships in cholinesterases revealed by oocyte expression of site-directed and natural variants of human BCHE. *Embo J* 1992, **11**, 1641-9.
305. Nisenbaum, R., D. H. Barrett, M. Reyes & W. C. Reeves: Deployment stressors and a chronic multisymptom illness among Gulf War veterans. *J Nerv Ment Dis.* 2000, **188**, 259-66.
306. Nisenbaum, R., K. Ismail, S. Wessely, C. Unwin, L. Hull & W. C. Reeves: Dichotomous factor analysis of symptoms reported by U.K. and U.S. veterans of the 1991 Gulf War. *Popul Health Metr* 2004, **2**, 8.
307. Niu, K. C., K. C. Lin, C. Y. Yang & M. T. Lin: Protective effects of alpha-tocopherol and mannitol in both circulatory shock and cerebral ischaemia injury in rat heatstroke. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003, **30**, 745-51.
308. O'Connor, T. M., D. J. O'Halloran & F. Shanahan: The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *Qjm* 2000, **93**, 323-33.
309. O'Connor, K. A., J. D. Johnson, M. K. Hansen, J. L. Wieseler Frank, E. Maksimova, L. R. Watkins & S. F. Maier: Peripheral and central proinflammatory cytokine response to a severe acute stressor. *Brain Res* 2003, **991**, 123-32.
310. Ohl, F. & E. Fuchs: Differential effects of chronic stress on memory processes in the tree shrew. *Brain Res Cogn Brain Res* 1999, **7**, 379-87.
311. Oitzl, M. S., H. van Oers, B. Schobitz & E. R. de Kloet: Interleukin-1 beta, but not interleukin-6, impairs spatial navigation learning. *Brain Res* 1993, **613**, 160-3.
312. Oitzl, M. S., A. D. van Haarst, W. Sutanto & E. R. de Kloet: Corticosterone, brain mineralocorticoid receptors (MRs) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rat as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology* 1995, **20**, 655-75.
313. Ovadia, H., O. Abramsky, S. Feldman & J. Weidenfeld: Evaluation of the effect of stress on the blood-brain barrier: critical role of the brain perfusion time. *Brain Res* 2001, **905**, 21-5.

314. Park, D., J. H. Jeon, S. Shin, Y. J. Jang, B. Choi, S. Nahm, J. K. Kang, S. Y. Hwang, J. C. Kim & Y. B. Kim: Debilitating stresses do not increase blood-brain barrier permeability : lack of the involvement of corticosteroids. *Environ Toxicol and Pharmacol* 2008, **26**, 30-37.
315. Parsons, S. M.: Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage. *Faseb J* 2000, **14**, 2423-34.
316. Patrick, J. & J. Lindstrom: Autoimmune response to acetylcholine receptor. *Science* 1973, **180**, 871-2.
317. Peinnequin, A., C. Mouret, O. Birot, A. Alonso, J. Mathieu, D. Clarencon, D. Agay, Y. Chancerelle & E. Multon: Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol.* 2004, **5**, 3.
318. Perry, E. K., C. J. Smith, R. H. Perry, C. Whitford, M. Johnson & N. J. Birdsall: Regional distribution of muscarinic and nicotinic cholinergic receptor binding activities in the human brain. *J Chem Neuroanat* 1989, **2**, 189-99.
319. Pfaffl, M. W.: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001, **29**, 2002-7.
320. Pizarro, J. M., L. S. Haro & E. J. Barea-Rodriguez: Learning associated increase in heat shock cognate 70 mRNA and protein expression. *Neurobiol Learn Mem* 2003, **79**, 142-51.
321. Pockley, A. G.: Heat shock proteins as regulators of the immune response. *Lancet* 2003, **362**, 469-76.
322. Powell, C. E., C. S. Watson & B. Gametchu: Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90. *Endocrine* 1999, **10**, 271-80.
323. Proctor, S., T. Heeren, R. F. White, J. Wolfe, M. S. Borgos, J. D. Davis, L. Pepper, R. Clapp, P. B. Sutker, J. J. Vasterling & D. Ozonoff: Health status of Persian Gulf War veterans : self-reported symptoms, environmental exposures and the effect of stress. *Int J Epidemiol* 1998, **27**, 1000-1010.
324. Racke, K., U. R. Juergens & S. Matthiesen: Control by cholinergic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 2006, **533**, 57-68.
325. Ramakers, C., J. M. Ruijter, R. H. Deprez & A. F. Moorman: Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 2003, **339**, 62-6.
326. Rand, J. B.: Acetylcholine. *WormBook* 2007, 1-21.
327. Ravagnan, L., S. Gurbuxani, S. A. Susin, C. Maise, E. Daugas, N. Zamzami, T. Mak, M. Jaattela, J. M. Penninger, C. Garrido & G. Kroemer: Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 2001, **3**, 839-43.

328. Reul, J. M. & E. R. de Kloet: Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985, **117**, 2505-11.
329. Ritossa, F. M.: A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962, **18**, 571-573.
330. Roberts, J. B., B. H. Thomas & A. Wilson: Placenta transfer of pyridostigmine in the rat. *Br J Pharmacol* 1970, **38**, 202-5.
331. Rojo, L., L. Conesa, O. Bermudez & L. Livianos: Influence of stress in the onset of eating disorders: data from a two-stage epidemiologic controlled study. *Psychosom Med* 2006, **68**, 628-35.
332. Rook, G. A. & A. Zumla: Gulf War syndrome: is it due to a systemic shift in cytokine balance towards a Th2 profile? *Lancet*. 1997, **349**, 1831-3.
333. Ropp, S. A., W. C. J. Grunwald, M. Morris & D. R. Cool: Pyridostigmine crosses the blood-brain barrier to induce cholinergic and non-cholinergic changes in mouse hypothalamus. *J Med CBR Def* 2008, **6**.
334. Rose, M. R. & K. A. Brix: Neurological disorders in Gulf War veterans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**, 605-18.
335. Rosenberg, O. S., S. Deindl, R. J. Sung, A. C. Nairn & J. Kuriyan: Structure of the autoinhibited kinase domain of CaMKII and SAXS analysis of the holoenzyme. *Cell* 2005, **123**, 849-60.
336. Rosenbloom, M., J. B. Leikin, S. N. Vogel & Z. A. Chaudry: Biological and chemical agents: a brief synopsis. *Am J Ther* 2002, **9**, 5-14.
337. Rothermel, B. A., R. B. Vega & R. S. Williams: The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in calcineurin signaling. *Trends Cardiovasc Med* 2003, **13**, 15-21.
338. Rothwell, N. J. & G. N. Luheshi: Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci* 2000, **23**, 618-25.
339. Rousseau, J. M., M. Ruttimann & L. Brinquin: Intoxications aigües par neurotoxiques organophosphorés : insecticides et armes chimiques. *Ann Fr Anesth Réanim* 2000, **19**, 588-98.
340. Ruggiero, G. M., S. Bertelli, L. Boccalari, F. Centorame, A. Ditucci, C. La Mela, A. Scarinci, P. Vinai, S. Scarone & S. Sassaroli: The influence of stress on the relationship between cognitive variables and measures of eating disorders (in healthy female university students): A quasi-experimental study. *Eat Weight Disord* 2008, **13**, 142-8.
341. Sajdy, T. J., J. S. Katner & A. Shekhar: Monoamines in the dorsomedial hypothalamus of rats following exposure to different tests of anxiety. *Prog neuro psychopharm biol Psychiatr* 1997, **21**, 193-209.

342. Sakimura, K., T. Kutsuwada, I. Ito, T. Manabe, C. Takayama, E. Kushiya, T. Yagi, S. Aizawa, Y. Inoue, H. Sugiyama & et al.: Reduced hippocampal LTP and spatial learning in mice lacking NMDA receptor epsilon 1 subunit. *Nature* 1995, **373**, 151-5.
343. Salamon, R., A. Alperovitch, F. Conso, M. A. Jutand, J. P. Boutin, Y. Coquin, R. Laroche, C. Paquet, F. Rouillon & P. Weinbreck: Rapport de mission du groupe de travail chargé d'analyser les données sanitaires relatives aux anciens combattants français de la guerre du Golfe, France, 2001.
344. Salamon, R., C. Verret, M. A. Jutand, M. Begassat, F. Laoudj, F. Conso & P. Brochard: Health consequences of the first Persian Gulf War on French troops. *Int J Epidemiol* 2006, **35**, 479-87.
345. Saleh, A., S. M. Srinivasula, L. Balkir, P. D. Robbins & E. S. Alnemri: Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2000, **2**, 476-83.
346. Salter, M. W.: Src, N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors, and synaptic plasticity. *Biochem Pharmacol* 1998, **56**, 789-98.
347. Sam, S. & L. A. Frohman: Normal physiology of hypothalamic pituitary regulation. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2008, **37**, 1-22.
348. Sanchez, M. M., L. J. Young, P. M. Plotsky & T. R. Insel: Distribution of corticosteroid receptors in the rhesus brain: relative absence of glucocorticoid receptors in the hippocampal formation. *J Neurosci* 2000, **20**, 4657-68.
349. Sandi, C., M. Loscertales & C. Guaza: Experience-dependent facilitating effect of corticosterone on spatial memory formation in the water maze. *Eur J Neurosci* 1997, **9**, 637-42.
350. Sandi, C., J. J. Merino, M. I. Cordero, K. Touyarot & C. Venero: Effects of chronic stress on contextual fear conditioning and the hippocampal expression of the neural cell adhesion molecule, its polysialylation, and L1. *Neuroscience* 2001, **102**, 329-39.
351. Sandi, C., J. C. Woodson, V. F. Haynes, C. R. Park, K. Touyarot, M. A. Lopez-Fernandez, C. Venero & D. M. Diamond: Acute stress-induced impairment of spatial memory is associated with decreased expression of neural cell adhesion molecule in the hippocampus and prefrontal cortex. *Biol Psychiatry*. 2005, **57**, 856-64.
352. Santoro, M. G.: Heat shock factors and the control of the stress response. *Biochem Pharmacol* 2000, **59**, 55-63.
353. Sapolsky, R., C. Rivier, G. Yamamoto, P. Plotsky & W. Vale: Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 1987, **238**, 522-4.

354. Sapolsky, R. M., L. M. Romero & A. U. Munck: How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000, **21**, 55-89.
355. Sartin, J. S.: Gulf War illnesses: causes and controversies. *Mayo Clin Proc.* 2000, **75**, 811-9.
356. Schaaf, M. J., J. O. Workel, H. M. Lesscher, E. Vreugdenhil, M. S. Oitzl & E. R. de Kloet: Correlation between hippocampal BDNF mRNA expression and memory performance in senescent rats. *Brain Res* 2001, **915**, 227-33.
357. Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, A. K. Lofquist & A. S. Baldwin, Jr.: Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science* 1995, **270**, 283-6.
358. Schulman, H.: Activity-dependent regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II localization. *J Neurosci.* 2004, **24**, 8399-403.
359. Schwabe, L., S. Dalm, H. Schachinger & M. S. Oitzl: Chronic stress modulates the use of spatial and stimulus-response learning strategies in mice and man. *Neurobiol Learn Mem* 2008, **90**, 495-503.
360. Schwaninger, M. G., G. Lux, R. Blujme, E. Oetjen, H. Hidaka & W. Knepel: Membrane depolarization and calcium influx induce glucagon gene transcription in pancreatic islet cells through the cyclic AMP-responsive element. *J Biol Chem* 1993, **268**, 5168-77.
361. Scremin, O. U., T. M. Shih, L. Huynh, M. Roch, R. Booth & D. J. Jenden: Delayed neurologic and behavioral effects of subtoxic doses of cholinesterase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, **304**, 1111-9.
362. Selye, H.: A syndrome produced by diverse nocuous agents 1936. *J Neuropsych Clin Neurosci.* 1936 (1998), **10**, 230-1.
363. Selye, H.: *Du rêve à la découverte.* Editions de La Presse, 1973.
364. Selye, H.: Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* 1950, **1**, 1383-92.
365. Servatius, R. J., J. E. Ottenweller, D. Beldowicz, W. Guo, G. Zhu & B. H. Natelson: Persistently exaggerated startle responses in rats treated with pyridostigmine bromide. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998, **287**, 1020-8.
366. Servatius, R. J., J. E. Ottenweller, W. Guo, D. Beldowicz, G. Zhu & B. H. Natelson: Effects of inescapable stress and treatment with pyridostigmine bromide on plasma butyrylcholinesterase and the acoustic startle response in rats. *Physiol Behav.* 2000, **69**, 239-46.
367. Sgard, F., E. Charpantier, S. Bertrand, N. Walker, D. Caput, D. Graham, D. Bertrand & F. Besnard: A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit. *Mol Pharmacol* 2002, **61**, 150-9.

368. Shaikh, J. & C. N. Pope: Combined forced running stress and subclinical paraoxon exposure have little effect on pyridostigmine-induced acute toxicity in rats. *Toxicology*. 2003, **190**, 221-30.
369. Sharabi, Y., Y. L. Danon, H. Berkenstadt, S. Almog, A. Mimouni-Bloch, A. Zisman, S. Dani & J. Atsmon: Survey of symptoms following intake of pyridostigmine during the Persian Gulf war. *Isr J Med Sci* 1991, **27**, 656-8.
370. Sharma, H. S., R. Kretzschmar, J. Cervos Navarro, A. Ermisch, H. J. Ruhle & P. K. Dey: Age-related pathophysiology of the blood-brain barrier in heat stress. *Prog Brain Res* 1992, **91**, 189-96.
371. Shieh, P. B., S. C. Hu, K. Bobb, T. Timmusk & A. Gosh: Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 1998, **20**, 727-740.
372. Shih, J. H., W. F. Liu, S. F. Lee, J. D. Lee, C. Ma & C. H. Lin: Acute effects of oral pyridostigmine bromide on conditioned operant performance in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1991, **38**, 549-53.
373. Shintani, F., S. Kanba, T. Nakaki, M. Nibuya, N. Kinoshita, E. Suzuki, G. Yagi, R. Kato & M. Asai: Interleukin-1 beta augments release of norepinephrine, dopamine, and serotonin in the rat anterior hypothalamus. *J Neurosci* 1993, **13**, 3574-81.
374. Shintani, F., T. Nakaki, S. Kanba, K. Sato, G. Yagi, M. Shiozawa, S. Aiso, R. Kato & M. Asai: Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotrophic hormone and in release of hypothalamic monoamines in the rat. *J Neurosci* 1995, **15**, 1961-70.
375. Sidell, F. R. & J. Borak: Chemical warfare agents: II. Nerve agents. *Ann Emerg Med* 1992, **21**, 865-71.
376. Sidell, F. R.: Nerve agents. In: *Textbook of military medicine : medical aspects of chemical and biological warfare agent*. Eds.: F. R. Sidell, E. T. Takafuji and D. R. Franz. Walter Reed Army Medical Center, Washington, 1997, pp. 129-79.
377. Silva, A. J., R. Paylor, J. M. Wehner & S. Tonegawa: Impaired spatial learning in alpha-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* 1992, **257**, 206-11.
378. Sim, M. & H. Kelsall: Gulf War illness: a view from Australia. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006, **361**, 619-26.
379. Sims, J. E.: IL-1 and IL-18 receptors, and their extended family. *Curr Opin Immunol* 2002, **14**, 117-22.
380. Sinton, C. M., T. E. Fitch, F. Petty & R. W. Haley: Stressful manipulations that elevate corticosterone reduce blood-brain barrier permeability to pyridostigmine in the Rat. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000, **165**, 99-105.

381. Smith, T. C., G. C. Gray & J. D. Knoke: Is systemic lupus erythematosus, amyotrophic lateral sclerosis, or fibromyalgia associated with Persian Gulf War service? An examination of Department of Defense hospitalization data. *Am J Epidemiol* 2000, **151**, 1053-9.
382. Smith, S. M. & W. W. Vale: The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci* 2006, **8**, 383-95.
383. Smoak, K. A. & J. A. Cidlowski: Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 2004, **125**, 697-706.
384. Smythies, J.: Section I. The cholinergic system. *Int Rev Neurobiol* 2005, **64**, 1-122.
385. Soetekouw, P. M., M. De Vries, F. W. Preijers, R. Van Crevel, G. Bleijenberg & J. W. Van Der Meer: Persistent symptoms in former UNTAC soldiers are not associated with shifted cytokine balance. *Eur J Clin Invest* 1999, **29**, 960-3.
386. Solana, R.P., C Gennings, W.H. Carter & al. Efficacy comparison of two cholinolytics, scopolamine and azapropen, when used in conjunction with physostigmine and pyridostigmine for protection against organophosphate exposure. *J Am Coll Toxicol* 1991, **10**, 215-22.
387. Somani, S. M., J. B. Roberts & A. Wilson: Pyridostigmine metabolism in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1972, **13**, 393-9.
388. Somani, S. M. & J. H. Anderson: Microsomal glucuronidation of a quaternary ammonium compound, 3-hydroxyphenyltrimethylammonium. *Drug Metab Dispos* 1977, **5**, 15-8.
389. Somani, S. M.: Metabolism and pharmacokinetics of pyridostigmine in rat after multiple dosing. *Pharmacologist* 1983, **25**, 97.
390. Somani, S. M.: Gulf War Syndrome : potential effects of low-level exposure to sarin and/or pyridostigmine under conditions of physical stress. *Testimony, subcommittee on Human Resources, U.S. House of Representatives.* 1997.
391. Somani, S. M. & K. Husain: Low-level nerve agent toxicity under normal and stressful conditions. In: *Chemical Warfare Agents : Toxicity at Low Levels.* Eds.: S. M. Somani and J. A. Romano. CRC Press, 2001, pp. 83-120.
392. Somogyi, P., I. W. Chubb & A. D. Smith: A possible structural basis for the extracellular release of acetylcholinesterase. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1975, **191**, 271-83.
393. Song, X., H. Tian, J. Bressler, S. Pruett & C. Pope: Acute and repeated restraint stress have little effect on pyridostigmine toxicity or brain regional cholinesterase inhibition in rats. *Toxicol Sci.* 2002, **69**, 157-64.
394. Song, X., C. Pope, R. Murthy, J. Shaikh, B. Lal & J. P. Bressler: Interactive Effects of Paraoxon and Pyridostigmine on Blood-Brain Barrier Integrity and Cholinergic Toxicity. *Toxicol Sci* 2004, **78**, 241-247.

395. Sorensen, P. S., H. Flachs, M. L. Friis, E. F. Hvidberg & O. B. Paulson: Steady state kinetics of pyridostigmine in myasthenia gravis. *Neurology* 1984, **34**, 1020-4.
396. Soreq, H., G. Ehrlich, M. Schwarz, Y. Loewenstein, D. Glick & H. Zakut: Mutations and impaired expression in the ACHE and BCHE genes: neurological implications. *Biomed Pharmacother* 1994, **48**, 253-9.
397. Soreq, H. & S. Seidman: Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2001, **2**, 294-302.
398. Sousa, N., N. V. Lukoyanov, M. D. Madeira, O. F. Almeida & M. M. Paula-Barbosa: Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement. *Neuroscience* 2000, **97**, 253-66.
399. Spencer, R. L., P. J. Kim, B. A. Kalman & M. A. Cole: Evidence for mineralocorticoid receptor facilitation of glucocorticoid receptor-dependent regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Endocrinology* 1998, **139**, 2718-26.
400. Spencer, P. S., L. A. McCauley, J. A. Lapidus, M. Lasarev, S. K. Joos & D. Storzbach: Self-reported exposures and their association with unexplained illness in a population-based case-control study of Gulf War veterans. *J Occup Environ Med* 2001, **43**, 1041-56.
401. Spiess, J., J. Rivier, C. Rivier & W. Vale: Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981, **78**, 6517-21.
402. Stellato, C.: Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc* 2004, **1**, 255-63.
403. Stier, C. T., Jr., L. I. Serova, G. Singh & E. L. Sabban: Stress triggered rise in plasma aldosterone is lessened by chronic nicotine infusion. *Eur J Pharmacol* 2004, **495**, 167-70.
404. Sun, C. Y., S. S. Qi, X. F. Lou, S. H. Sun, X. Wang, K. Y. Dai, S. W. Hu & N. B. Liu: Changes of learning, memory and levels of CaMKII, CaM mRNA, CREB mRNA in the hippocampus of chronic multiple-stressed rats. *Chin Med J (Engl)*. 2006, **119**, 140-7.
405. Suzuki, K., B. Murtuza, I. A. Sammut, N. Latif, J. Jayakumar, R. T. Smolenski, Y. Kaneda, Y. Sawa, H. Matsuda & M. H. Yacoub: Heat shock protein 72 enhances manganese superoxide dismutase activity during myocardial ischemia-reperfusion injury, associated with mitochondrial protection and apoptosis reduction. *Circulation* 2002, **106**, I270-6.
406. Szelenyi, J.: Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull* 2001, **54**, 329-38.
407. Talbot, B. G., D. R. Anderson, L. W. Harris, L. W. Yarbrough & W. J. Lennox: A comparison of in vivo and in vitro rates of aging of soman-inhibited erythrocyte acetylcholinesterase in different animal species. *Drug Chem Toxicol* 1988, **11**, 289-305.
408. Tasker, J. G., S. Di & R. Malcher-Lopes: Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology* 2006, **147**, 5549-56.

409. Taylor, T., D. R. Hawkins, T. J. Forrest & H. Chung: Pharmacokinetics of pyridostigmine in dogs. *J Pharm Sci* 1991, **80**, 353-6.
410. Taylor, D. M. & S. K. Taylor: Environmental uranium and human health. *Rev Environ Health* 1997, **12**, 147-57.
411. Taysse, L., D. Christin, S. Delamanche, B. Bellier & P. Breton: Peripheral ChE inhibition modulates brain monoamines levels and c-fos oncogene in mice subjected to a stress situation. *Neurochem Res* 2005, **30**, 391-402.
412. Telang, F. W., Y. S. Ding, N. D. Volkow, P. E. Molina & S. J. Gatley: Pyridostigmine, a carbamate acetylcholinesterase AChE inhibitor and reactivator, is used prophylactically against chemical warfare agents. *Nucl Med Biol.* 1999, **26**, 249-50.
413. Thomas, H. V., N. J. Stimpson, A. Weightman, F. Dunstan & G. Lewis: Pain in veterans of the Gulf War of 1991: a systematic review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2006, **7**, 74.
414. Tian, H., X. Song, J. Bressler, S. Pruetz & C. N. Pope: Neither forced running nor forced swimming affect acute pyridostigmine toxicity or brain-regional cholinesterase inhibition in rats. *Toxicology.* 2002, **176**, 39-50.
415. Tohmi, M., N. Tsuda, Y. Watanabe, A. Kakita & H. Nawa: Perinatal inflammatory cytokine challenge results in distinct neurobehavioral alterations in rats: implication in psychiatric disorders of developmental origin. *Neurosci Res* 2004, **50**, 67-75.
416. Tohmi, M., N. Tsuda, Y. Zheng, M. Mizuno, H. Sotoyama, M. Shibuya, M. Kawamura, A. Kakita, H. Takahashi & H. Nawa: The cellular and behavioral consequences of interleukin-1 alpha penetration through the blood-brain barrier of neonatal rats: a critical period for efficacy. *Neuroscience* 2007, **150**, 234-50.
417. Torpy, J. M., T. J. Glass & R. M. Glass: JAMA patient page. Myasthenia gravis. *Jama* 2005, **293**, 1940.
418. Torres, S. J. & C. A. Nowson: Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 2007, **13**, 13.
419. Touyarot, K. & C. Sandi: Chronic restraint stress induces an isoform-specific regulation on the neural cell adhesion molecule in the hippocampus. *Neural Plast* 2002, **9**, 147-59.
420. Touyarot, K., C. Venero & C. Sandi: Spatial learning impairment induced by chronic stress is related to individual differences in novelty reactivity: search for neurobiological correlates. *Psychoneuroendocrinology* 2004, **29**, 290-305.
421. Troakes, C. & C. D. Ingram: Anxiety behaviour of the male rat on the elevated plus maze: associated regional increase in c-fos mRNA expression and modulation by early maternal separation. *Stress* 2008, **1**.

422. Tsien, J. Z., P. T. Huerta & S. Tonegawa: The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 1996, **87**, 1327-38.
423. Tsigos, C. & G. P. Chrousos: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002, **53**, 865-71.
424. Turnbull, A. V. & C. L. Rivier: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999, **79**, 1-71.
425. Tyler, W. J., M. Alonso, C. R. Bramham & L. D. Pozzo-Miller: From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem* 2002, **9**, 224-37.
426. Ulrich-Lai, Y. M., H. F. Figueiredo, M. M. Ostrander, D. C. Choi, W. C. Engeland & J. P. Herman: Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006, **291**, E965-73.
427. Umemoto, S., Y. Kawai, T. Ueyama & E. Senba: Chronic glucocorticoid administration as well as repeated stress affects the subsequent acute immobilization stress-induced expression of immediate early genes but not that of NGFI-A. *Neuroscience* 1997, **80**, 763-73.
428. Unwin, C., N. Blatchley, W. Coker, S. Ferry, M. Hotopf, L. Hull, K. Ismail, I. Palmer, A. David & S. Wessely: Health of UK servicemen who served in Persian Gulf War. *Lancet*. 1999, **353**, 169-78.
429. van der Laan, S. & O. C. Meijer: Pharmacology of glucocorticoids: beyond receptors. *Eur J Pharmacol* 2008, **585**, 483-91.
430. van Haaren, F., R. De Jongh, J. B. Hoy, J. L. Karlix, C. J. Schmidt, I. R. Tebbett & D. Wielbo: The effects of acute and repeated pyridostigmine bromide administration on response acquisition with immediate and delayed reinforcement. *Pharmacol Biochem Behav* 1999, **62**, 389-94.
431. Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe & F. Speleman: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002, **3**, 1-12.
432. Vasterling, J. J. & J. D. Bremner: The impact of the 1991 Gulf War on the mind and brain: findings from neuropsychological and neuroimaging research. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006, **361**, 593-604.
433. Vaynman, S., Z. Ying & F. Gomez-Pinilla: Interplay between brain-derived neurotrophic factor and signal transduction modulators in the regulation of the effects of exercise on synaptic-plasticity. *Neuroscience* 2003, **122**, 647-57.

434. Vaynman, S., Z. Ying & F. Gomez-Pinilla: The select action of hippocampal calcium calmodulin protein kinase II in mediating exercise-enhanced cognitive function. *Neuroscience*. 2007, **144**, 825-33.
435. Veenema, A. H. & I. D. Neumann: Neurobiological mechanisms of aggression and stress coping: a comparative study in mouse and rat selection lines. *Brain Behav Evol* 2007, **70**, 274-85.
436. Venero, C., T. Tilling, I. Hermans-Borgmeyer, A. I. Herrero, M. Schachner & C. Sandi: Water maze learning and forbrain mRNA expression of the neural cell adhesion molecule L1. *J Neurosci Res* 2004, **75**, 172-181.
437. Verret, C., M. A. Jutand, C. De Vigan, M. Begassat, L. Bensefa-Colas, P. Brochard & R. Salamon: Reproductive health and pregnancy outcomes among French gulf war veterans. *BMC Public Health* 2008, **8**, 141.
438. Veterans'illnesses, Research advisory committee on Gulf war veterans'illnesses: Gulf war illness and the health of gulf war veterans, 2008.
439. Voellmy, R. & F. Boellmann: Chaperone regulation of the heat shock protein response. *Adv Exp Med Biol* 2007, **594**, 89-99.
440. Walker, G., J. Pfeilschifter & D. Kunz: Mechanisms of suppression of inducible nitric-oxide synthase (iNOS) expression in interferon (IFN)-gamma-stimulated RAW 264.7 cells by dexamethasone. Evidence for glucocorticoid-induced degradation of iNOS protein by calpain as a key step in post-transcriptional regulation. *J Biol Chem* 1997, **272**, 16679-87.
441. Watts, A. G.: Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 2005, **26**, 109-30.
442. White, R. F., S. P. Proctor, T. Heeren, J. Wolfe, M. Krengel, J. Vasterling, K. Lindem, K. J. Heaton, P. Sutker & D. M. Ozonoff: Neuropsychological function in Gulf War veterans: relationships to self-reported toxicant exposures. *Am J Ind Med* 2001, **40**, 42-54.
443. Willis, C. L., L. Leach, G. J. Clarke, C. C. Nolan & D. E. Ray: Reversible disruption of tight junction complexes in the rat blood-brain barrier, following transitory focal astrocyte loss. *Glia* 2004, **48**, 1-13.
444. Wolf, G., R. Yirmiya, T. Kreisel, I. Goshen, J. Weidenfeld, S. Poole & Y. Shavit: Interleukin-1 signaling modulates stress-induced analgesia. *Brain Behav Immun* 2007, **21**, 652-9.
445. Wolfe, J., D. J. Erickson, E. J. Sharkansky, D. W. King & L. A. King: Course and predictors of posttraumatic stress disorder among Gulf War veterans: a prospective analysis. *J Consult Clin Psychol* 1999, **67**, 520-8.

446. Wolthuis, O. L. & R. A. Vanwersch: Behavioral changes in the rat after low doses of cholinesterase inhibitors. *Fundam Appl Toxicol* 1984, **4**, S195-208.
447. Wolthuis, O. L., B. Groen, R. W. Busker & H. P. van Helden: Effects of low doses of cholinesterase inhibitors on behavioral performance of robot-tested marmosets. *Pharmacol Biochem Behav* 1995, **51**, 443-56.
448. Wood, G. E., L. T. Young, L. P. Reagan & B. S. McEwen: Acute and chronic stress alter the incidence of social conflict in male rats. *Hormones and Behavior* 2003, **43**, 205-213.
449. Wood, G. E., E. H. Norris, E. Waters, J. T. Stoldt & B. S. McEwen: Chronic immobilization stress alters aspects of emotionality and associative learning in the rat. *Behav Neurosci* 2008, **122**, 282-92.
450. Woodson, J. C., D. Macintosh, M. Fleshner & D. M. Diamond: Emotion-induced amnesia in rats: working memory-specific impairment, corticosterone-memory correlation, and fear versus arousal effects on memory. *Learn Mem* 2003, **10**, 326-36.
451. Wu, Z. Y., Y. Zhang & J. Xiao: Rules of protein expression of proto-oncogene (c-Fos/c-Jun) in different brain areas and nucleus of psychological stressed mice and the regulatory effect of modified Xiaoyao Pill. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2006, **26**, 998-1002.
452. Xu, F., M. R. Plummer, G. W. Len, T. Nakazawa, T. Yamamoto, I. B. Black & K. Wu: Brain-derived neurotrophic factor rapidly increases NMDA receptor channel activity through Fyn-mediated phosphorylation. *Brain Res* 2006, **1121**, 22-34.
453. Yamada, Y., T. Takatori, M. Nagao, H. Iwase, N. Kuroda, J. Yanagida & T. Shinozuka: Expression of paraoxonase isoform did not confer protection from acute sarin poisoning in the Tokyo subway terrorist attack. *Int J Legal Med* 2001, **115**, 82-4.
454. Yamada, K., M. Mizuno & T. Nabeshima: Role for brain-derived neurotrophic factor in learning and memory. *Life Sci* 2002, **70**, 735-44.
455. Yamada, K. & T. Nabeshima: Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 2003, **91**, 267-70.
456. Yamamoto, K., Y. Sawada & T. Iga: Comparative pharmacokinetics of four cholinesterase inhibitors in rats. *Biol Pharm Bull.* 1995, **18**, 1292-5.
457. Yamamoto, Y. & R. B. Gaynor: IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci* 2004, **29**, 72-9.
458. Yamamura, H. I., M. J. Kuhar & S. H. Snyder: In vivo identification of muscarinic cholinergic receptor binding in rat brain. *Brain Res* 1974, **80**, 170-6.
459. Yamauchi, T. & H. Fujisawa: Evidence for three distinct forms of calmodulin-dependent protein kinases from rat brain. *FEBS Lett* 1980, **116**, 141-4.

460. Yamauchi, T.: Neuronal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II--discovery, progress in a quarter of a century, and perspective: implication for learning and memory. *Biol Pharm Bull.* 2005, **28**, 1342-54.
461. Yanaura, M., M. Nakashima, S. Yamada & S. Shiono: Characterization of slow postsynaptic K<sup>+</sup> current of Aplysia LUQ neurons in culture. *Brain Res* 1993, **629**, 88-94.
462. Yirmiya, R., G. Winocur & I. Goshen: Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 2002, **78**, 379-89.
463. Zhang, Q., X. D. Zhou, T. Denny, J. E. Ottenweller, G. Lange, J. J. LaManca, M. H. Lavietes, C. Pollet, W. C. Gause & B. H. Natelson: Changes in immune parameters seen in Gulf War veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, **6**, 6-13.
464. Zhang, Y. M., Q. Yang, C. T. Xu, K. S. Li & W. Q. Li: Effects of phenytoin on morphology and structure of hippocampal CA3 pyramidal neurons of rats in chronic stress. *Acta Pharmacol Sin* 2003, **24**, 403-7.
465. Zhao, B., S. M. Moochhala, J. Lu, D. Tan & M. H. Lai: Determination of pyridostigmine bromide and its metabolites in biological samples. *J Pharm Pharm Sci.* 2006, **9**, 71-81.
466. Zheng, Z., J. Y. Kim, H. Ma, J. E. Lee & M. A. Yenari: Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008, **28**, 53-63.
467. Zhou, J., H. An, H. Xu, S. Liu & X. Cao: Heat shock up-regulates expression of Toll-like receptor-2 and Toll-like receptor-4 in human monocytes via p38 kinase signal pathway. *Immunology* 2005, **114**, 522-30.