Modulation of cytokine production by social environment and susceptibility to infections

Elodie Merlot

▶ **To cite this version:**

Elodie Merlot. Modulation of cytokine production by social environment and susceptibility to infections. Sciences of the Universe [physics]. INAPG (AgroParisTech), 2003. English. NNT : 2003INAP0021 . pastel-00000790

HAL Id: pastel-00000790
https://pastel.hal.science/pastel-00000790

Submitted on 23 Jul 2004

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.

INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON

Ecole Doctorale ABIES

Département des Sciences Animales

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon

Discipline : Physiologie animale

présentée et soutenue publiquement par

Elodie Merlot

le 21 novembre 2003

Modulation de la production de cytokines par l'environnement social et susceptibilité aux infections

Modulation of cytokine production by social environment and susceptibility to infections

Jury :

M. Daniel Sauvant	Professeur de l'INA-PG	Président
Mme Isabelle Veissier	Directeur de recherche INRA	Rapporteur
M. Jean-Marc Cavaillon	Chef de laboratoire Institut Pasteur	Rapporteur
Mme Christine Duvaux-Ponter	Maître de conférence de l'INA-PG	Examinateur
M. Robert Dantzer	Directeur de recherche INRA	Examinateur
Mme Armelle Prunier	Directeur de recherche INRA	Directeur de thèse
M. Pierre J Neveu	Chargé de recherche INSERM	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier le Professeur Daniel Sauvant qui a accepté de présider le jury de cette thèse.

Je remercie sincèrement Isabelle Veissier et Jean-Marc Cavaillon d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je tiens également à remercier Robert Dantzer de m'avoir accueilli dans son laboratoire et d'être présent dans le jury de cette thèse.

Je remercie Pierre Neveu et Armelle Prunier pour leur encadrement et leur soutien, ainsi que les membres du comité de thèse pour leur accompagnement au cours de ces trois années (Isabelle Oswald, Bernard Charley, Jean Le Dividich, Christine Duvaux-Ponter et Robert Dantzer).

Merci à Christine Duvaux-Ponter de m'avoir fait découvrir puis accompagnée dans le monde du bien-être animal depuis la deuxième année de l'Agro, ainsi que pour son aide scientifique et pratique tout au long de ma thèse.

Un très grand merci à Elisabeth Moze. Ce fût un plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta confiance, tes encouragements et ton amitié.

Je remercie chaleureusement tous ceux qui, à Bordeaux comme à Rennes, m'ont apporté leur aide scientifique ou technique et leur amitié.

Résumé

Les conséquences immunitaires d'un stress d'origine environnementale sont complexes et encore difficilement prévisibles. Le stress affecte le système immunitaire soit en agissant sur l'immunité innée, en altérant la réactivité inflammatoire, soit en agissant sur l'immunité acquise, en modulant la production de cytokines dites Th1 et Th2. L'environnement social contribue largement au développement et à l'expression de maladies. Dans les espèces sociales, la position sociale occupée dans le groupe module la susceptibilité aux infections mais les supports endocriniens et immunitaires de ces différences de susceptibilité sont ignorés. La remise en cause de l'organisation sociale engendre un stress important dont les conséquences immunitaires sont encore sujettes à controverse.

Ce travail de thèse a pour objectifs (1) de décrire l'influence du statut social sur le fonctionnement des systèmes endocrinien et immunitaire, (2) de préciser les effets du stress social sur la production de cytokines et la susceptibilité aux infections et (3) de rechercher des facteurs à l'origine de la variabilité des conséquences immunitaires du stress social.

Chez le porcelet, un regroupement après le sevrage élève transitoirement le cortisol salivaire et altère le comportement mais n'affecte pas la réactivité des lymphocytes sanguins. La suite des travaux a utilisé une procédure de défaite sociale chronique chez la souris. Les résultats obtenus mettent en évidence une influence du statut social. En absence de stress, les dominants présentent des niveaux de base de corticostérone et une réponse spécifique à la tuberculine supérieurs aux dominés. Suite à une défaite sociale, les dominants sont plus affectés que les dominés. La défaite sociale augmente la réactivité inflammatoire mais ne modifie pas de façon nette l'équilibre de la production de cytokines de type Th1 et Th2 et n'affecte pas l'immunité spécifique développée contre une infection mycobactérienne. Les conséquences immunitaires de la défaite sociale ne sont observées que lorsque le stress est associé à des combats et à des blessures. Ces travaux montrent que la réponse au stress dépend de l'histoire sociale de l'individu, en particulier de son statut social. De plus, les répercussions immunitaires du stress dépendent aussi de l'histoire immunitaire récente. En effet, une réaction inflammatoire systémique inhibe la libération plasmatique de cytokines inflammatoires en réponse à un stress psychologique ultérieur.

Mots-clés: stress social, statut social, balance Th1/Th2, inflammation, Souris.

Abstract

The immune consequences of environmental stress are complex and difficult to predict. Stress affects the immune system either at the level of innate immunity, through the alteration of inflammatory reactivity, or at the level of acquired immunity, through the modulation of Th1 and Th2 cytokines. In social species, social environment contributes to the development and expression of diseases. The social position in a group modulates susceptibility to infections. However, the endocrine and immune mechanisms involved in these differences are not known. Instability in the social organization generates a severe stress of which immune consequences are still controversial.

The purposes of this thesis are (1) to describe the influence of social status on the endocrine and immune systems, (2) to specify the effects of social stress on cytokine production and susceptibility to infections and (3) to look for possible sources of variability in the immune consequences of social stress.

Mixing piglets after weaning transiently increases salivary cortisol and modifies behavior but does not affect blood lymphocyte reactivity. The following experiments used a procedure of chronic social defeat in mice. Results show an influence of social status. In the absence of stress, dominants show higher basal corticosterone levels and specific response to tuberculin than subordinates. After social defeat, dominants are more affected. Social defeat increases inflammatory reactivity but does not clearly modify the balance between Th1 and Th2 cytokines production and does not affect the development of specific immunity against a mycobacterial infection. Immune effects of social defeat can be observed only when the stress involves significant fights and injuries. Our work shows that the response to stress depends on individual social experience, in particular on social status. Furthermore the immune consequences of stress depend on recent immune experience. Indeed a systemic inflammatory challenge inhibits the release of plasma inflammatory cytokines in response to a subsequent psychological stress.

Key words: social stress, social status, Th1/Th2 balance, inflammation, mice.

Table des matières

REMERCIEMENTS **2**

RÉSUMÉ **3**

ABSTRACT **4**

TABLE DES MATIÈRES **5**

LISTE DES TABLEAUX **9**

LISTE DES FIGURES **10**

LISTE DES ANNEXES **11**

PUBLICATIONS **12**

CONTEXTE AGRONOMIQUE ET SOCIAL **14**

INTRODUCTION GÉNÉRALE **16**

LA RÉPONSE DE STRESS **17**

I. LES CONCEPTS D'HOMÉOSTASIE ET DE STRESS 17

II. LA RÉPONSE NEUROENDOCRINIENNE 18

III. MODULATION HORMONALE DES FONCTIONS IMMUNITAIRES 19

CONSÉQUENCES DU STRESS SUR L'IMMUNITÉ **20**

I. RAPPELS D'IMMUNOLOGIE 20

A. La réponse inflammatoire *20*

B. La réponse du système de l'immunité acquise *21*

II. CONSÉQUENCES DU STRESS SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES 23

A. Stress et cellules de l'immunité innée *23*

B. Stress et cellules de l'immunité acquise *24*

C. Influence du stress sur la balance Th1/Th2 ..... *25*

D. Production de cytokines inflammatoires et résistance aux glucocorticoïdes *27*

III. CONSÉQUENCES DU STRESS AU NIVEAU TISSULAIRE 29

A. Redistribution spatiale des leucocytes *29*

B. Augmentation de l'immunité acquise au niveau des muqueuses *30*

C. Modulation de la réponse inflammatoire au niveau des différents tissus *31*

IV. CONSÉQUENCES DU STRESS SUR LA SUSCEPTIBILITÉ AUX INFECTIONS....34

SOURCES DE VARIABILITÉ DE LA RÉPONSE AU STRESS....36

I. DIFFÉRENCES LIÉES À LA NATURE DU STRESS....36
II. DIFFÉRENCES LIÉES À L'INDIVIDU....37
A. Traits de personnalité....37
B. Statut social....39
C. Origine des différences individuelles....40

OBJECTIFS DE LA THÈSE....44

JUSTIFICATION DES OBJECTIFS....45

I. ENVIRONNEMENT SOCIAL STABLE....45
II. ENVIRONNEMENT SOCIAL INSTABLE....46
A. Conséquences endocriniennes....46
B. Conséquences immunitaires....47
C. Importance de la défaite ou de la victoire....48

OBJECTIFS DE LA THÈSE....50

I. INFLUENCE DU STATUT SOCIAL SUR LES SYSTÈMES NEUROENDOCRINIEN ET IMMUNITAIRE....50
II. CONSÉQUENCES NEUROENDOCRINIENNES ET IMMUNITAIRES DE L'INSTABILITÉ SOCIALE....51
III. SOURCES DE VARIABILITÉ DANS LA RÉPONSE AU STRESS SOCIAL....51

PRÉSENTATION DES MODÈLES UTILISÉS....53

I. LE MODÈLE DE DÉFAITE SOCIALE CHRONIQUE....53
II. LE MODÈLE INFECTIEUX BCG....54
A. Présentation du modèle....54
B. Etudes préliminaires....55

RÉSULTATS....57

1ER CHAPITRE : CONSÉQUENCES COMPORTEMENTALES, ENDOCRINIENNES ET IMMUNITAIRES D'UN CHALLENGE SOCIAL CHEZ LE PORC.....60

2ÈME CHAPITRE : EFFETS DE LA DÉFAITE SOCIALE SUR LA PRODUCTION DE CYTOKINES CHEZ LA SOURIS....76

3ÈME CHAPITRE : CONSÉQUENCES IMMUNES DE LA DÉFAITE SOCIALE CHEZ DES SOURIS INFECTÉES PAR LA SOUCHE BCG DE *M. BOVIS*.....93

4ÈME CHAPITRE : INFLUENCE DU STATUT SOCIAL SUR LA RÉACTIVITÉ À UN STRESS SOCIAL OU IMMUNITAIRE.....107

5ÈME CHAPITRE : IMPORTANCE DES COMBATS SUR LES CONSÉQUENCES IMMUNITAIRES DE LA DÉFAITE SOCIALE....128

6ÈME CHAPITRE : EFFET D'UN PRÉTRAITEMENT PAR LE LPS SUR LES RÉPONSES ENDOCRINIENNES ET IMMUNES À UN STRESS DE CONTENTION....137

DISCUSSION GÉNÉRALE....144

DANS QUELLES CONDITIONS L'ENVIRONNEMENT SOCIAL EST-IL CAPABLE D'AFFECTER LE SYSTÈME IMMUNITAIRE? 145

I. DANS UN ENVIRONNEMENT SOCIAL STABLE....145
A. Activité endocrinienne 145
B. Réactivité immunitaire....146
II. DANS UN ENVIRONNEMENT SOCIAL INSTABLE....148
A. Effet d'un regroupement unique 148
B. Effet de l'instabilité sociale chronique....150

COMMENT LA DÉFAITE SOCIALE MODULE-T-ELLE LA PRODUCTION DE CYTOKINES?....152

I. PRODUCTION D'IL-6 PLASMATIQUE 152
II. PRODUCTION DE CYTOKINES PRO-INFLAMMATOIRES PAR LES SPLÉNOCYTES....154
A. Production spontanée 154
B. Production induite par le LPS....154
III. ABSENCE DE DÉVIATION VERS UN PROFIL TH2 155

QUELLES SONT LES CONSÉQUENCES DE LA DÉFAITE SOCIALE (SDR) SUR LA RÉSISTANCE À UNE INFECTION PAR LE BCG?....158

I. CONSÉQUENCES DU SDR SUR UNE INFECTION AU BCG....158
A. Résultats attendus....158
B. Effets du SDR sur les splénocytes de souris infectées par le BCG....159
C. Effet du SDR sur la croissance bactérienne....160
II. EXPLICATIONS POSSIBLES DE L'ABSENCE D'EFFET DU SDR....160
A. L'intensité du stress....160
B. La cinétique des effets du SDR....161
C. Une désensibilisation au stress due à l'infection....161

QUELLES SONT LES SOURCES DE VARIABILITÉ DANS LES CONSÉQUENCES IMMUNITAIRES DE LA DÉFAITE SOCIALE?....163

I. L'HISTOIRE DE L'INDIVIDU....163
A. Importance du statut social....163
B. Importance de l'état d'activation du système immunitaire....165
II. LA COMPOSANTE PHYSIQUE DU STRESS SOCIAL....169
A. Conséquences immunitaires des stress psychologiques et des stress « mixtes »....169

B. Mécanismes possibles de modulation de la réactivité immunitaire par la composante physique du stress social *171*

CONCLUSION **174**

BIBLIOGRAPHIE **178**

LISTE DES ABRÉVIATIONS **209**

FORMATIONS SUIVIES PENDANT LA THÈSE **212**

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PROFILS DE RÉACTIVITÉ CHEZ LE RAT. 38
TABLEAU 2 : PROFILS DE RÉACTIVITÉ CHEZ LE PORC 39
TABLEAU 3 : INFLUENCE DU STATUT SOCIAL SUR L'ACTIVITÉ ENDOCRINIENNE ET LA RÉACTIVITÉ IMMUNITAIE (SYNTHÈSE DES RÉSULTATS). 147
TABLEAU 4 : CONSÉQUENCES ENDOCRINIENNES ET IMMUNITAIRES DE LA DÉFAITE SOCIALE. INFLUENCE DES COMBATS ET DU STATUT SOCIAL INITIAL (SYNTHÈSE DES RÉSULTATS). 164

Liste des figures

FIGURE 1 : SYSTEMES NEUROENDOCRINIENS ACTIVES LORS DU STRESS.....18
FIGURE 2 : INITIATION DE LA REPONSE PRIMAIRE ET ORIENTATION VERS UNE REPONSE DE TYPE TH1 OU TH2.....22
FIGURE 3 : ACTION DES GLUCOCORTICOÏDES ET DES CATECHOLAMINES SUR LA BALANCE TH1/TH2.....25
FIGURE 4 : EFFETS DU STRESS SUR L 'IMMUNITE INNEE ET ACQUISE.....33
FIGURE 5 : SOURCES DE VARIABILITE DE LA REPONSE AU STRESS.....40
FIGURE 6 : CINETIQUE D'INFECTION PAR 1000 CFU DE BCG ET DEVELOPPEMENT DE LA REPONSE SPECIFIQUE....56
FIGURE 7 : OBJECTIFS DE LA THESE.....59
FIGURE 8 : PRODUCTION IN VITRO D'IL-6 PAR LES SPLENOCYTES.....136
FIGURE 9 : EFFETS DU SDR SUR LA REACTIVITE INFLAMMATOIRE ET L'ORIENTATION TH1 / TH2 DES SPLENOCYTES.....156

Liste des annexes

LISTE DES ABREVIATIONS.....209
FORMATIONS SUIVIES PENDANT LA THESE 212

Publications

Articles de périodiques

Merlot E., Moze E., Dantzer R. and Neveu P.J. Suppression of restraint-induced plasma cytokines in mice pretreated with LPS. *Stress*, 2002, 5, 131-135.

Neveu P.J. and Merlot E. 2003. Cytokine stress responses depend on lateralization in mice. *Stress*, 2003, 6, 5-9.

Merlot E., Moze E., Dantzer R. and Neveu P.J. Importance of fighting in the immune effects of social defeat. *Physiology and Behavior*, 2003, 80, 351-357.

Bartolomucci A., Palanza P., Parmigiani S., Pederzani T., Merlot E., Neveu P.J., Dantzer R. Chronic psychosocial stress down-regulates central cytokines mRNA. *Brain Research Bulletin*. Sous presse.

Merlot E., Moze E., Bartolomucci A., Dantzer R. and Neveu P.J. Social rank assessed in a food competition test influences reactivity to immune and social stress. *Brain, Behavior, and Immunity*. Sous presse.

Merlot E., Moze E., Dantzer R. and Neveu P.J. Immune alterations induced by social defeat do not alter the course of a on-going BCG infection in mice. *Neuroimmunomodulation*. Sous presse.

Merlot E., Meunier-Salaün M.-C., Prunier A. Behavioural, endocrine and immune consequences of mixing in weaned piglets. *Applied Animal Behaviour Science*. Soumis.

Merlot E., Moze E., Dantzer R. and Neveu P.J. Cytokine profile during social defeat in mice. Soumis.

Chapitre dans un ouvrage imprimé:

Merlot E., Neveu P.J. “Les perturbations biologiques au cours du stress. Que mesurer? Comment mesurer?” 2003. Stress, Pathologies et Immunité. Editeurs J.-M. Thurin et N. Baumann, Editions Flammarion Medecine – Sciences. Paris.

Communication dans un congrès:

Merlot E., Dong J., Mrabet O., Moze E., Li K.S., Dantzer R., Neveu P.J. The cytokinergic response to stress depends on lateralization. 9th international meeting of the Psychoneuroimmunology Research Society. Madison, Wisconsin. May 2002.

Contexte agronomique et social

Depuis la conception de Descartes, selon laquelle l'animal ne serait qu'une machine, le statut de l'animal au sein de la société occidentale a fortement évolué. Au siècle des lumières, la rupture catégorique entre l'Homme et l'animal est rejetée par les philosophes qui reconnaissent que l'animal est doué de sensibilité. La doctrine utilitariste qui progresse à partir de cette époque dans les pays anglo-saxons mène à l'idée que les animaux ont des droits (à ne pas souffrir, au plaisir) et que l'homme a le devoir de les faire respecter (Burgat, 2001). Ainsi, le code pénal français punit les actes de cruauté envers les animaux.

Pendant la seconde moitié du vingtième siècle, l'intensification et l'industrialisation de l'agriculture métamorphosent le métier d'éleveur. Les exigences de productivité et de rentabilité se traduisent par la spécialisation et l'automatisation des unités de production. La préoccupation essentielle est d'augmenter les performances des animaux pour réduire les coûts de production. Pendant la même période, l'exode du monde rural vers le milieu urbain bouleverse profondément les rapports de l'homme à l'animal. Aujourd'hui, le citadin n'a souvent pour référence de relation « homme – animal » que celle qu'il entretient avec ses animaux de compagnie. Cette conception le mène à juger d'autant plus sévèrement les conditions d'élevage imposées à certaines espèces. L'élevage hors-sol porcin est parmi les secteurs les plus critiqués pour ses conditions « inhumaines ».

En réponse à la pression sociétale, le bien-être animal est devenu objet d'étude par les scientifiques (Dantzer and Mormède, 1979). Au niveau européen, les directives se succèdent visant à améliorer le bien-être de l'animal d'élevage. Une des missions de l'INRA est de proposer des critères objectifs pour évaluer l'état de bien- (mal-) être des animaux, d'identifier les principaux facteurs de stress et de proposer des modes d'élevage plus respectueux des besoins des animaux. Le stress peut affecter le système immunitaire et accroître la susceptibilité des animaux aux maladies. Les interactions entre le système neuroendocrinien et le système immunitaire sont responsables de ces altérations. L'utilisation de marqueurs immunitaires peut donc apporter une dimension supplémentaire à l'évaluation du bien-être, en complément d'autres mesures de type physiologique ou comportemental. De plus, démontrer que certaines pratiques d'élevage stressantes affectent la résistance aux maladies peut être un argument de poids pour convaincre la profession d'améliorer le bien-être de l'animal d'élevage. Un tel argument prend toute son importance dans un contexte de réduction de l'utilisation des antibiotiques en élevage.

Introduction Générale

La réponse de stress

I. Les concepts d'homéostasie et de stress

Le concept d'homéostasie trouve son origine dans la pensée de Claude Bernard (1813-1878), selon qui « la fixité du milieu intérieur est la condition de vie libre et indépendante ». Loin d'être indifférent au monde extérieur, l'organisme, au contraire, entretient avec lui une relation précise et informée, de telle sorte que son équilibre résulte des compensations continues d'une balance extrêmement sensible. Physiologie et pathologie sont en directe correspondance et la guérison n'est que le recouvrement de l'état physiologique normal. En continuité avec Claude Bernard, Walter Cannon (1871-1945) développe le concept d'homéostasie (Le Moal, 2003). Toutes les parties de l'organisme sont en contact intime avec une matrice liquide. L'homéostasie est l'état stable de cette matrice, protégée des changements. Cannon propose que les glandes surrénales et le système sympathique, en déversant l'adrénaline dans le sang, assurent l'équilibre homéostatique. Le système nerveux central participe à cette tâche en percevant l'environnement extérieur par ses récepteurs sensoriels, en communiquant et régulant l'environnement intérieur via le système nerveux autonome. La pathologie apparaît quand les ajustements homéostatiques défaillent.

Les notions de stress et de « syndrome général d'adaptation » apparaissent avec l'endocrinologiste canadien Hans Selye (1907-1982). Le syndrome biologique du stress serait une réaction d'alarme de l'organisme en réponse à des facteurs d'agression physiologiques ou psychologiques qui nécessitent une adaptation. Selon Selye, cette réponse est non spécifique : « Le stress est le résultat non spécifique de toute demande exercée sur l'organisme, que l'effet soit mental ou somatique. » Si le stress continue, l'organisme développe un état de résistance ou d'adaptation, caractérisé par la sécrétion accrue de glucocorticoïdes par la corticosurrénale. Un stade d'épuisement, pouvant conduire à la mort, apparaît si le stress devient chronique et que l'organisme ne peut plus s'adapter. Le terme de stress est en réalité assez ambigu puisqu'il désigne à la fois l'agent causal à l'origine du processus (le facteur de stress ou *stressor* en anglais), et la tentative d'adaptation engagée par l'organisme en réponse à cette tension (Selye, The stress of life, 1956).

Dans les années 70, les travaux de J.W.Mason et S.Levine mettent l'accent sur le fait que les facteurs psychologiques sont parmi les plus puissants stimuli pouvant affecter l'activité de l'axe corticotrope. L'activation du système résulte de variables comme la nouveauté, l'incertitude, les conflits. De larges différences individuelles apparaissent selon l'analyse de la situation, les buts et les mécanismes de défense des individus. L'axe corticotrope est alors présenté comme un index sensible et objectif de l'état émotionnel et psychologique de l'individu.

II. La réponse neuroendocrinienne

La réponse à un stress aigu chez un vertébré peut-être décrite dans le cadre de la situation suivante : un animal est attaqué par un prédateur par surprise. Il essaie de fuire son agresseur, mais celui-ci continue à le poursuivre et à lui infliger des blessures. Ce stress met en jeu différents systèmes physiologiques et psychologiques nécessaires à la survie de l'animal. D'une part, le stress augmente le niveau de vigilance cognitive de l'animal et induit une perception émotionnelle du danger qui constitue ce que l'on appelle le « stress psychologique ». D'autre part, l'organisme doit assurer une activité musculaire intense pour permettre la fuite ou le combat, être prêt à réparer d'éventuelles blessures et à éliminer rapidement les bactéries envahissant la blessure.

Cette préparation de l'organisme est assurée par une forte activation neuroendocrinienne. La première vague, qui survient en quelques secondes, correspond à la libération de catécholamines (adrénaline et noradrénaline) par les terminaisons du système nerveux sympathique et par les glandes surrénales. Cette première réponse est responsable de l'augmentation de la pression artérielle, du rythme cardiaque et de la concentration plasmatique en acides gras libres et en glucose. En parallèle, l'activation de l'hypothalamus par les centres supérieurs (système mésolimbique, amygdale) conduit à la sécrétion de corticolibérine (cortico-releasing hormone ou CRH) dans le système porte hypothalamo-hypophysaire. L'hypophyse répond à la libération de CRH par la sécrétion d'adénocorticotropine (adenocorticotropin hormone ou ACTH). L'activation hypothalamique conduit aussi à une diminution de la libération de GnRH (gonadotropine releasing hormone), suivie d'une chute de la sécrétion des hormones gonadotropes. L'hypophyse sécrète de la prolactine, de l'hormone thyréotrope (TSH) et de l'hormone de croissance (GH). La seconde vague de la réponse implique les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Elle se développe

en quelques minutes (Fig.1). La libération de glucocorticoïdes par les surrénales est stimulée par l'ACTH, tandis que la sécrétion des stéroïdes sexuels par les gonades décroît.

III. Modulation hormonale des fonctions immunitaires

La réponse neuroendocrinienne permet de mettre le système immunitaire en état d'alerte. En effet, les cellules immunitaires disposent de récepteurs pour bon nombre des acteurs neuroendocriniens cités ci-dessus. Les récepteurs des glucocorticoïdes, de la prolactine, de l'hormone de croissance, de l'œstradiol ou de la testostérone sont exprimés par les cellules immunitaires. En général, les glucocorticoïdes, les androgènes, la progestérone et l'ACTH dépriment les fonctions immunitaires, alors que la GH, la prolactine, la thyroxine et l'insuline les stimulent (Besedovsky and Del Rey, 1996; Dorshkind and Horseman, 2001). Le système immunitaire intègre aussi des informations nerveuses : les organes lymphoïdes primaires (thymus, moelle osseuse) et secondaires (rate et ganglions) sont sous le contrôle de terminaisons nerveuses sympathiques et cholinergiques (Felten and Felten, 1991). Les leucocytes expriment des récepteurs pour de nombreux neurotransmetteurs et neuropeptides : récepteurs â-adrénergiques, récepteurs aux endorphines, aux enképhalines, à la substance P, à la somatostatine et au peptide vasointestinal (Blalock, 1989).

Les glucocorticoïdes sont connus pour leur activité anti-inflammatoire et immunomodulatrice (Munck *et al.*, 1984). Lors d'une réponse inflammatoire, ils inhibent la production de cytokines inflammatoires par les macrophages et les lymphocytes T, ils aident à réguler la réponse de fièvre et favorisent la production de protéines de la phase aiguë par le foie (Munck *et al.*, 1984; Wilckens and De Rijk, 1997). Ils inhibent aussi la prolifération des lymphocytes T, diminuent l'activité bactéricide des macrophages et suppriment l'activité cytotoxique des cellules tueuses naturelles (NK). Cependant, les glucocorticoïdes peuvent aussi exercer des propriétés immunostimulantes sur les lymphocytes B (Wilckens and De Rijk, 1997). Ils favorisent la recirculation des cellules immunitaires (Dhabhar *et al.*, 1995). Le système sympathique exerce également un contrôle sur le trafic des cellules immunitaires, notamment en favorisant la libération de chémokines qui attirent les neutrophiles sur le lieu de l'inflammation (Elenkov *et al.*, 2000). Les catécholamines orientent la différenciation des cellules T, modulent la prolifération lymphocytaire, l'activité bactéricide des macrophages et l'activité cytotoxique des NK (Elenkov *et al.*, 2000). Elles peuvent jouer un rôle tantôt immunostimulant, tantôt immunosuppresseur.

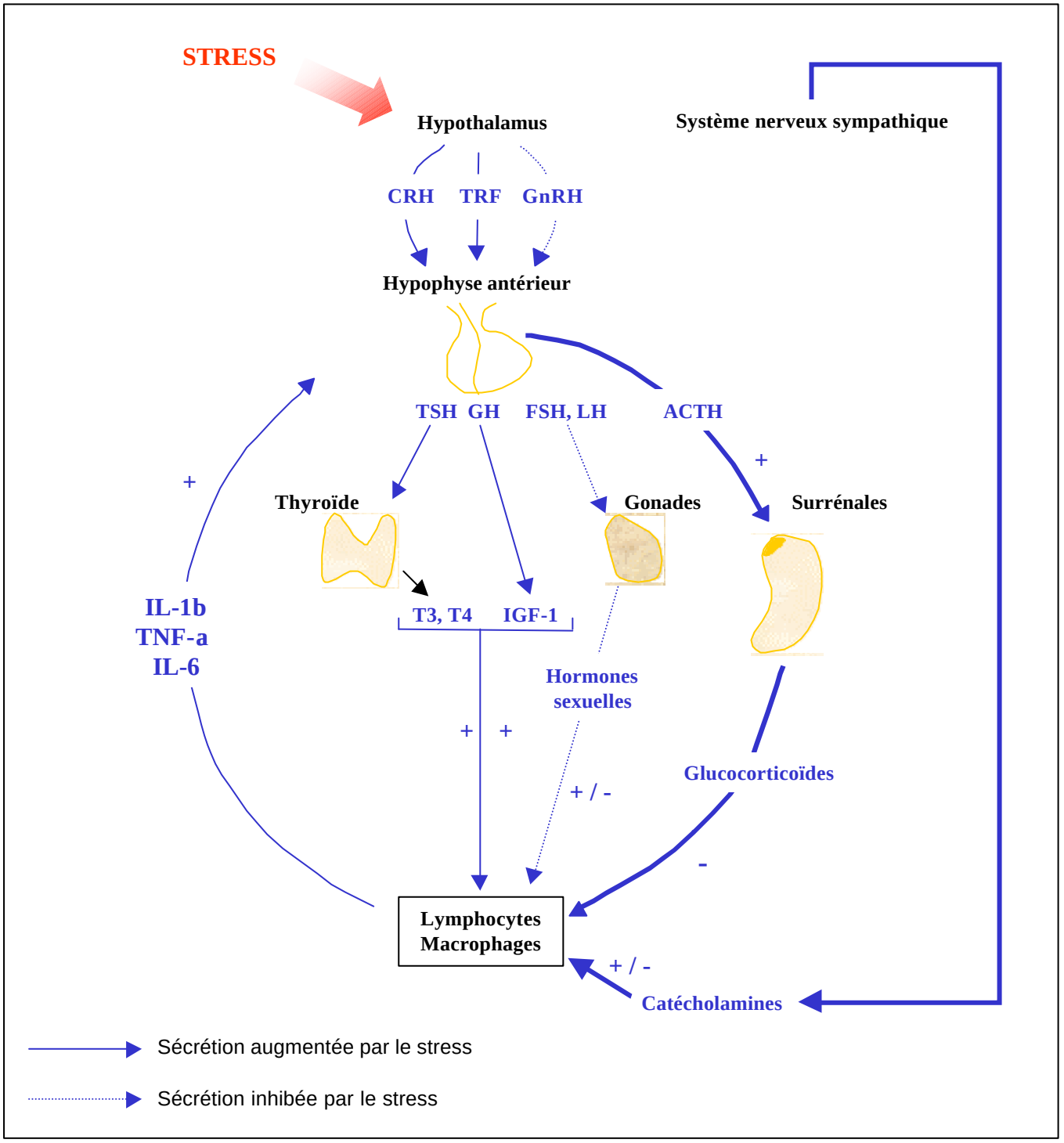


Figure 1: Systèmes neuroendocriniens activés lors du stress.

Le stress affecte le système immunitaire en modifiant la sécrétion des hormones hypophysaires et en activant le système sympathique. En retour, le système nerveux central est informé de l'activation du système immunitaire grâce à la libération d'IL-1β, d'IL-6 et de TNF-α par les cellules immunes.

(ACTH: adénocorticotropine, CRH: corticolibérine, FSH: hormone folliculo-stimulante, GnRH: hormone de libération de la LH, IGF-1: facteur de croissance 1 analogue à l'insuline, IL-1β: interleukine 1β, IL-6: interleukine 6, LH: hormone lutéinisante, TNF-α: facteur de nécrose tumorale α ,TRF: thyrolibérine, TSH: hormone stimulatrice de la thyroïde, T3: triiodotyrosine, T4: thyroxine)

Conséquences du stress sur l'immunité

La présentation faite ci-dessous tente de synthétiser les connaissances actuelles sur les effets du stress sur l'immunité. Les données sur ce sujet sont très disparates. Elles proviennent d'études réalisées sur des espèces et des lignées d'animaux différentes, utilisant divers facteurs de stress, avec des durées et des fréquences du stress variables. Nous présenterons d'abord les résultats d'études utilisant des techniques *in vitro*, montrant comment le stress modifie les fonctions et la réactivité des cellules immunitaires. Dans un second temps, les résultats d'études menées *in vivo* seront présentés, illustrant les répercussions de ces altérations au niveau tissulaire. Enfin, les conséquences sur la susceptibilité à une infection bactérienne ou virale seront présentées. Avant de développer ces différents points, les étapes fondamentales de la réponse immunitaire à un pathogène seront rappelées.

I. Rappels d'immunologie

A. La réponse inflammatoire

L'immunité innée est considérée comme la première « ligne de défense » lors des interactions hôte-pathogène. Quand un pathogène pénètre dans l'organisme, il est rapidement ingéré et détruit par les phagocytes en place. Si l'arrivée du pathogène est associée à des dommages tissulaires ou s'il est présent en trop grande quantité, un certain nombre de réponses sont engagées pour le contenir et l'éliminer. La réponse inflammatoire est un élément majeur de ce processus.

La réaction inflammatoire est une réponse normale, immédiate et transitoire à toute agression extérieure, qu'elle soit mécanique ou infectieuse (Cavaillon, 1996). Elle a pour objet de diriger les molécules sériques et les cellules du système immunitaire vers le site de la lésion tissulaire. Elle peut se décomposer en trois éléments : augmentation du flux sanguin, augmentation de la perméabilité des vaisseaux capillaires, migration des cellules immunitaires depuis les vaisseaux vers les tissus. En réponse à l'agression, les cellules des tissus lésés produisent des médiateurs moléculaires (histamine, sérotonine, prostaglandines...) qui sont à l'origine de la production en cascade d'autres médiateurs nécessaires à l'enclenchement et à

l'entretien d'un état inflammatoire. Certaines cytokines ont un rôle essentiel dans l'orchestration d'une inflammation d'origine microbienne. Ce sont notamment l'interleukine-1 (IL-1) et le facteur de nécrose tumorale (TNF-α). Les macrophages et les polynucléaires recrutés éliminent les pathogènes éventuellement présents en les phagocytant et en libérant des radicaux libres. La réponse inflammatoire initie aussi le processus de cicatrisation tissulaire.

D'autres facteurs sont produits pour limiter la production de cytokines pro-inflammatoires ou en contrecarrer les effets. Ces agents anti-inflammatoires sont constitués par des cytokines (transforming growth factor-β (TGF-β), IL-10, IL-4), des antagonistes de récepteurs (antagoniste du récepteur de l'IL-1), des formes solubles de récepteurs pour les cytokines, ou des glucocorticoïdes. Dès que l'inflammation locale atteint une certaine importance, l'organisme est « averti » du processus par le passage de cytokines inflammatoires, notamment de l'interleukine-6 (IL-6), dans la circulation sanguine. L'IL-6 induit la libération par le foie de protéines de la phase aiguë (Protéine C-réactive (CRP), haptoglobine...), dont la fonction est de terminer la réponse inflammatoire (Tilg *et al.*, 1997). Une réponse harmonieuse sous-entend un équilibre réussi entre les cytokines pro-inflammatoires et les facteurs chargés d'en limiter la production et l'action. Dans le cas contraire, par des mécanismes d'auto-entretien et d'amplification, la réponse inflammatoire peut s'accentuer et entraîner un état pathologique.

B. La réponse du système de l'immunité acquise

Si la progression du pathogène n'est pas enrayée par la réponse inflammatoire, l'immunité acquise constitue une seconde ligne de défense. Contrairement au système de l'immunité innée, elle est spécifique d'un pathogène donné.

Lors d'une première rencontre avec le pathogène, les cellules dendritiques phagocytent des pathogènes et migrent dans les ganglions lymphatiques les plus proches. Elles exposent alors à leur membrane des peptides antigéniques issus du pathogène, liés aux molécules du complexe d'histocompatibilité de type II (CMH II). La présentation du complexe CMH-antigène aux lymphocytes T CD4 naïfs, en association avec des signaux de co-stimulation, conduit à l'activation des lymphocytes spécifiques de cet antigène (Palucka and Banchereau, 1999). Les lymphocytes activés produisent de l'IL-2, ils prolifèrent et se différencient en

cellules T auxiliaires (Th). Les Th activent alors des lymphocytes B, producteurs d'immunoglobulines spécifiques de l'antigène, et des lymphocytes T CD8 (T8), également spécifiques des antigènes portés par le pathogène (Fig. 2). Les cellules activées par les Th entrent en division. C'est ce qu'on appelle la prolifération clonale. Puis elles acquièrent un phénotype de cellule effectrice : plasmocyte dans un cas, lymphocyte T cytotoxique dans l'autre.

L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques, puis celle des lymphocytes B et T8 par les lymphocytes Th sont permises par des contacts cellulaires directs et par la production de cytokines. Ces cytokines orientent la réponse vers une médiation majoritairement cellulaire, dite de type 1 ou bien majoritairement humorale, dite de type 2. Dans le cas d'un pathogène de nature intracellulaire, la cellule dendritique libère de l'IL-12, qui permet la différenciation des lymphocytes Th en cellules de type 1 (Th1) (Maldonado-Lopez and Moser, 2001). Les Th1 produisent principalement de l'IL-2, de l'interferon-γ (IFN-γ), et de la lymphotoxine α (LT-α). L'IFN-γ favorise l'activation des lymphocytes T8, capables de lyser les cellules du soi infectées. Dans le cas d'un pathogène de nature extracellulaire, la cellule dendritique oriente les lymphocytes Th vers une différenciation de type 2 (Th2). Les Th2 produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 qui favorisent la maturation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'immunoglobulines (Fig. 2).

La réponse spécifique met plusieurs jours à se développer dans le cas d'une primo-infection, mais seulement quelques dizaines d'heures si l'antigène a déjà été rencontré. En effet, lors d'une deuxième rencontre avec le pathogène, l'organisme dispose de cellules T mémoires pour l'antigène. L'activation des lymphocytes mémoires ne nécessite pas nécessairement la collaboration avec une cellule dendritique car les macrophages ou les lymphocytes B sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) tout à fait acceptables pour les cellules mémoires. La réponse contre le pathogène est alors beaucoup plus rapide que lors d'une réponse primaire.

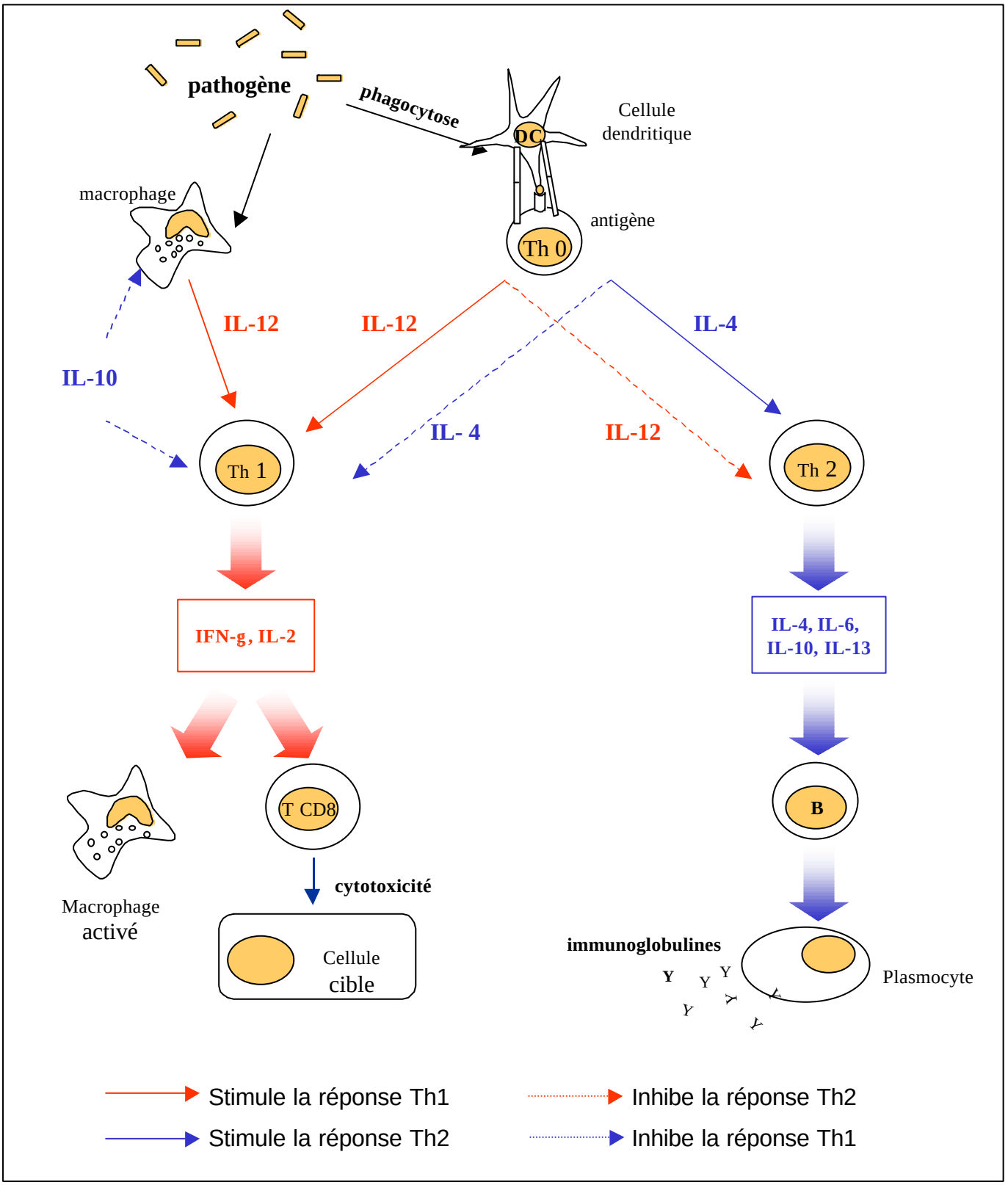


Figure 2: Initiation de la réponse primaire et orientation vers une réponse de type Th1 ou Th2.

II. Conséquences du stress sur les cellules immunitaires

A. Stress et cellules de l'immunité innée

1) Le stress module l'activité anti-microbienne

Les effets du stress sur les macrophages dépendent fortement du compartiment dans lequel ils se trouvent. Un stress aigu peut inhiber ou favoriser certaines fonctions antimicrobiennes des macrophages et des neutrophiles. Selon la procédure de stress et le compartiment étudié, le stress diminue ou augmente la production d'oxyde nitrique (NO) (Fleshner *et al.*, 1998; Persoons *et al.*, 1997). L'activité phagocytaire des macrophages spléniques peut être stimulée par un stress aigu (Lyte *et al.*, 1990). Si le stress est chronique, l'activité phagocytaire et la production de NO sont plutôt inhibées (Brown *et al.*, 1993; Palermo-Neto *et al.*, 2003). La production de superoxide (H_2O_2) semble être décrue par le stress, que celui-ci soit de nature aiguë ou chronique (De Castro *et al.*, 2000; Oishi *et al.*, 2003).

2) Le stress inhibe la présentation de l'antigène aux lymphocytes

Une autre fonction des cellules de l'immunité innée est de présenter les antigènes aux lymphocytes T. Ce rôle est rempli par les CPA (cellules dendritiques et macrophages). Le stress peut inhiber la fonction de présentation de l'antigène en diminuant l'expression des molécules du CMH II par les macrophages et par les cellules dendritiques (Hosoi *et al.*, 1998; Zwilling *et al.*, 1990). En particulier, la capacité de l'IFN-γ à induire l'expression des molécules du CMH II par les macrophages péritonéaux est décrue chez les animaux stressés (Jiang *et al.*, 1990; Zwilling *et al.*, 1992). Simultanément, la CPA présente d'autres molécules membranaires qui constituent des signaux de co-stimulation nécessaires à une présentation efficace de l'antigène. Les glucocorticoïdes inhibent aussi l'expression des molécules de co-stimulation par les cellules dendritiques (Moser *et al.*, 1995).

B. Stress et cellules de l'immunité acquise

1) Stress immunosuppresseur ou immunostimulant

Le stress a longtemps été considéré comme immunosuppresseur parce qu'il inhibe certaines fonctions lymphocytaires. Par exemple, il peut diminuer la concentration plasmatique des anticorps produits en réponse à une vaccination (Moraska *et al.*, 2002; Zalcman *et al.*, 1988). *In vitro*, le stress inhibe aussi la prolifération lymphocytaire (Fleshner *et al.*, 1995a; Rinner *et al.*, 1992; Shurin *et al.*, 1994) et la production de cytokines par les lymphocytes (Dobbs *et al.*, 1996; Fleshner *et al.*, 1995b; Sonnenfeld *et al.*, 1992). Cependant, l'inhibition des lymphocytes par le stress n'est pas systématique. Le stress peut parfois augmenter la production d'anticorps (Cocke *et al.*, 1993; Fujiwara and Orita, 1987; Wood *et al.*, 1993) et la prolifération des lymphocytes (Lysle *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1993).

Quelques études suggèrent qu'il existe une fenêtre précise pendant laquelle le développement de la réponse spécifique peut être altéré par le stress. Lors d'une réponse primaire, l'exposition au stress juste avant ou pendant les 24 heures suivant la vaccination serait une période critique. Un stress survenant plus tardivement n'aurait que peu ou pas d'effet (Kusnecov and Rabin, 1993; Moynihan *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1993; Zalcman *et al.*, 1988).

2) Les lymphocytes sont inhibés par des macrophages « suppresseurs »

L'activation du système de l'immunité innée lors du stress pourrait être responsable de l'inhibition de certaines fonctions lymphocytaires. En effet, la libération de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1 semble associée à l'inhibition de la production d'anticorps après une stimulation antigénique (Moraska *et al.*, 2002). De plus, l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T dans la rate ou dans les ganglions lymphatiques après un stress disparaît si l'on enlève les macrophages de la culture cellulaire (Coussons-Read *et al.*, 1994; Fleshner *et al.*, 1995a). Il est probable que les macrophages exercent leur propriété suppressive via la production de NO (Coussons-Read *et al.*, 1994). Dans la rate, la diminution de la prolifération lymphocytaire est induite par les catécholamines puisque l'utilisation d'antagonistes des récepteurs β-adrénergiques prévient l'effet du stress. Le rôle des glucocorticoïdes serait moins important puisque l'adrénalectomie ne supprime pas l'effet

inhibiteur du stress (Cunnick *et al.*, 1990). En revanche, la suppression de la prolifération des lymphocytes sanguins serait plutôt permise par les glucocorticoïdes (Cunnick *et al.*, 1990).

C. Influence du stress sur la balance Th1/Th2

Il a été proposé qu'en conditions de stress aigu, la réponse immunitaire basculerait vers un profil de type Th2 (Elenkov and Chrousos, 1999). La théorie de la balance Th1/Th2 est séduisante car elle permet d'expliquer nombre de pathologies associées au stress (Fig. 3). En orientant le système immunitaire vers une réponse de type humoral, le stress aurait un effet immunosuppresseur lorsque l'organisme doit faire face à une infection virale ou bactérienne qui nécessite le plus souvent une réponse Th1, mais pourrait en même temps favoriser une exacerbation des réponses allergiques ou des maladies autoimmunes, caractérisées par un profil Th2.

1) Influence du stress sur la balance Th1/Th2

L'orientation vers le profil Th2 par le stress a été montrée à plusieurs niveaux. Le rapport entre les sous-classes d'anticorps produites lors d'une réponse humorale est un indicateur de l'orientation Th1/Th2. En effet, si l'IL-4 est nécessaire pour induire la maturation des lymphocytes B lors d'une réponse primaire, les cytokines de type Th1 et Th2 déterminent ensuite le type de commutation isotypique des immunoglobulines. Un lymphocyte B se transforme en cellule productrice d'anticorps de sous-classe IgG2a s'il a été mis en présence d'IFN-γ, une cytokine Th1. En présence de cytokines Th2, il se différencie en plasmocyte producteur d'IgG1 ou d'IgE (Comoy *et al.*, 1997). Lorsque le stress augmente la production d'anticorps en réponse à une vaccination, cet accroissement est dû aux IgM et IgG1 mais pas aux IgG2a (Shanks and Kusnecov, 1998). Inversement, lorsque le stress diminue la production d'anticorps, celle-ci concerne les IgG2a mais pas les IgG1 (Fleshner *et al.*, 1996). Dans les deux cas, la balance est en faveur des immunoglobulines de type Th2.

Une autre méthode consiste à compter le nombre de clones de type Th1 et Th2 dans les organes lymphatiques en réponse à une vaccination. La présence du marqueur moléculaire CD45RC sur les lymphocytes Th permet de différencier les cellules de type Th1 ($CD45RC^+$) de celles de type Th2 ($CD45RC^-$). Chez le rat, des chocs électriques empêchent l'accumulation de lymphocytes $CD45RC^+$ en réponse à une immunisation contre la KLH (protéine antigénique « keyhole lymphet hemocyanin ») dans les ganglions mésentériques et

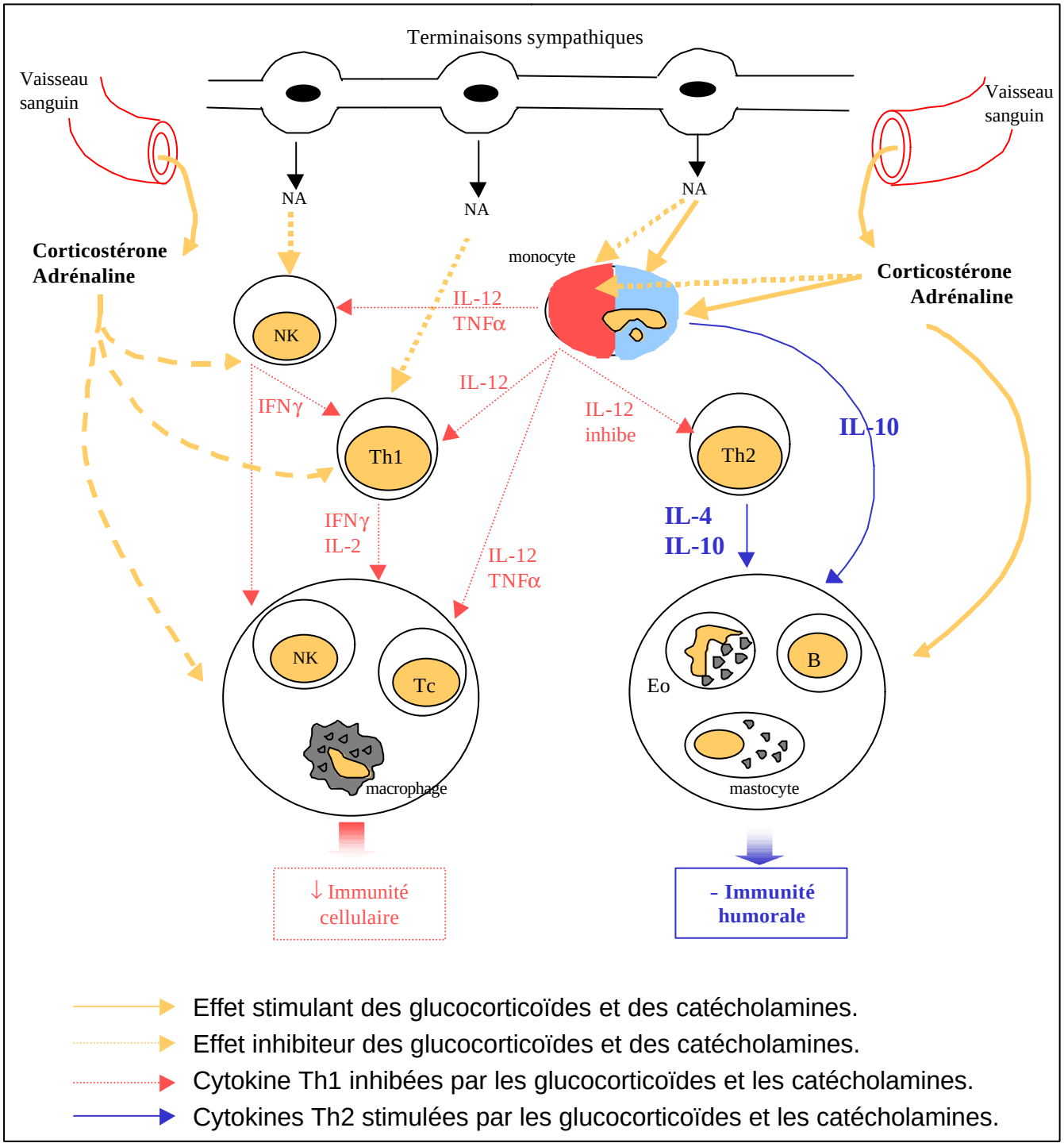


Figure 3: Action des glucocorticoïdes et des catécholamines sur la balance Th1/Th2.

Tiré de Elenkov et Chrousos, 1999. NK: cellule tueuse naturelle; Tc: lymphocyte T8 cytotoxique; Eo: éosinophile; NA: noradrénaline.

dans la rate. Au contraire, le nombre de lymphocytes CD45RC$^-$ a tendance à augmenter (Fleshner *et al.*, 1995b).

Enfin, la balance Th1/Th2 peut être appréciée en mesurant la quantité de cytokines de type 1 et 2 produites *in vitro*. Certaines études rapportent effectivement une orientation de la production de cytokines vers le type Th2 (Iwakabe *et al.*, 1998; Moynihan *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1998). Cependant, cette orientation n'est pas observée dans tous les cas puisque d'autres observent une suppression simultanée des deux types de cytokines (Dobbs *et al.*, 1996) ou au contraire une orientation de type Th1 (Bartolomucci *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2002; Maes *et al.*, 1998). Ces dernières études laissent supposer que le stress n'oriente pas systématiquement le système immunitaire vers un profil Th2.

2) Influence des glucocorticoïdes et des catécholamines sur la balance Th1/Th2

Le basculement vers un profil Th2 lors du stress s'expliquerait par le fait que les glucocorticoïdes favorisent la production de cytokines de type Th2 par les lymphocytes T CD4 et inhibent la production de cytokines Th1 (Daynes and Araneo, 1989; Ramírez *et al.*, 1996). Le rôle des catécholamines dans la régulation de la balance Th1/Th2 est moins clair et il semble que la sensibilité des lymphocytes T aux catécholamines dépende du moment auquel ils y sont exposés (Ramer-Quinn *et al.*, 1997; Ramer-Quinn *et al.*, 2000; Swanson *et al.*, 2001). Globalement, les catécholamines inhibent les lymphocytes de type 1. Les clones Th1 expriment le récepteur adrénergique β2 et leur exposition *in vitro* à un agoniste du récepteur inhibe la production d'IL-2 et d'IFN-γ. En revanche, le récepteur β2-adrénergique est indétectable sur les clones Th2 et leur production de cytokines n'est pas altérée par les catécholamines (Ramer-Quinn *et al.*, 1997).

D. Production de cytokines inflammatoires et résistance aux glucocorticoïdes

1) Le stress augmente la production de cytokines inflammatoires

La plupart des études concernant la production de cytokines par les cellules immunes après stress utilisent des mitogènes spécifiques des lymphocytes T ou B (phytohémagglutinine, concanavaline A, pokeweed) ou des antigènes contre lesquels l'animal avait été préalablement vacciné (globules rouges de mouton, KLH...). Des études récentes se sont intéressées à la capacité de ces cellules à produire une réponse de type inflammatoire, en utilisant par exemple du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est une macromolécule de la paroi des bactéries à Gram négatif qui stimule préférentiellement les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages. Il semble que le stress puisse accroître la production de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 ou l'IL-6 par les cellules spléniques en réponse au LPS (Moraska *et al.*, 2002; Stark *et al.*, 2001). De même, les macrophages péritonéaux ou alvéolaires issus de souris stressées présentent une production accrue d'IL-1 et d'IL-6 de façon spontanée (Jiang *et al.*, 1990) ou en réponse à une stimulation par du LPS (Persoons *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 1996).

Il est vraisemblable que les catécholamines soient impliquées dans cette production de cytokines inflammatoires. En effet, le blocage des récepteurs β-adrénergiques avant l'administration de chocs électriques empêche l'augmentation de la production d'IL-1β par les macrophages alvéolaires (Broug-Holub *et al.*, 1998). D'autre part, il a été proposé que le stress pourrait exacerber les réponses de type inflammatoire en induisant la libération locale de CRH par les terminaisons nerveuses périphériques (Elenkov and Chrousos, 1999). En effet, le CRH potentialise la libération de TNF-α, d'IL-1β et d'IL-6 par les macrophages (Agelaki *et al.*, 2002). Il augmente la perméabilité vasculaire et induit la dégranulation des mastocytes qui libèrent de l'histamine (Theoharides, 1998).

Un mécanisme moléculaire permettant de convertir le stress en réponse inflammatoire a récemment été proposé. La voie de transcription du facteur nucléaire κB (NF-κB) est l'une des principales voies de signalisation intracellulaire responsables de l'expression de cytokines inflammatoires (Muzio and Mantovani, 2000; O'Neill and Dinarello, 2000). Chez l'homme, un stress aigu active la voie NF-κB dans les cellules mononucléées sanguines et induit

l'expression des gènes qui en dépendent (Bierhaus *et al.*, 2003). La noradrénaline pourrait être responsable de cette activation puisqu'elle est en mesure d'activer la voie NF-κB des monocytes sanguins via les récepteurs α1- et β-adrénergiques (Bierhaus *et al.*, 2003).

2) Le stress induit un état de résistance aux glucocorticoïdes

Après une session de chocs électriques ou un stress social chronique, la sensibilité des cellules immunitaires à l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est diminuée (O'Connor *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2001). Cela se traduit par un moindre effet inhibiteur de l'hormone sur la prolifération des cellules immunitaires et sur leur production de cytokines inflammatoires (Stark *et al.*, 2001). Chez la souris, il a pu être montré que cette modification de sensibilité concerne les macrophages mais pas les lymphocytes B (Stark *et al.*, 2001). De façon intéressante, la résistance aux glucocorticoïdes n'apparaît pas dans tous les compartiments ; elle est observée dans la rate mais pas dans la cavité péritonéale (Avitsur *et al.*, 2002a). Ce phénomène s'atténue progressivement après l'arrêt du stress. Ainsi, la résistance induite par le stress social chez la souris est toujours visible dix jours après la fin du stress mais a totalement disparu au bout d'un mois (Avitsur *et al.*, 2002a).

Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de la résistance aux glucocorticoïdes par le stress ne sont pas entièrement élucidés. Le stress ne modifie pas l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes (GR). En revanche, il empêche la migration du GR du cytoplasme vers le noyau (Quan *et al.*, 2003). Le stress empêche donc le complexe GR-hormone d'inhiber la transcription des gènes de la voie NFκB tels que ceux des cytokines pro-inflammatoires. Les mécanismes par lesquels le stress affecte la translocation des GR sont en revanche inconnus.

Tous les stress ne sont pas en mesure d'induire un phénomène de résistance aux glucocorticoïdes. Par exemple, la contention augmente au contraire de façon transitoire la sensibilité des splénocytes aux glucocorticoïdes (Bauer *et al.*, 2001). Il est possible que l'activité physique associée au stress soit pour partie impliquée puisque l'exercice physique chez l'humain diminue aussi la sensibilité des lymphocytes sanguins à la dexaméthasone, un stéroïde de synthèse (Derijk *et al.*, 1996). Stress et activité physique induisant une libération d'IL-6 plasmatique, son rôle potentiel dans l'induction de la résistance a été testé *in vitro* (Stark *et al.*, 2002). L'IL-6 ne semble pas moduler pas la sensibilité des splénocytes. Il est tout de même possible que la production de certaines cytokines pendant le stress soit

responsable de l'apparition de la résistance. En effet, chez l'homme, la culture de cellules mononucléées sanguines en présence d'IL-4 et d'IL-2 entraîne un état de résistance aux glucocorticoïdes (Kam *et al.*, 1993). Cependant, dans cette situation, la résistance apparaît chez les lymphocytes T et non chez les macrophages.

III. Conséquences du stress au niveau tissulaire

A. Redistribution spatiale des leucocytes

Les cellules du système immunitaire circulent en permanence. Elles quittent le sang vers les organes, passent ensuite par les vaisseaux et les ganglions lymphatiques avant de rejoindre la circulation générale (Jalkanen and Salmi, 2001). Lors de la réponse de stress, l'activation du système nerveux sympathique permet le recrutement des leucocytes en les faisant sortir de réservoirs tels que la rate, le thymus ou les poumons et en les déversant dans le sang (Dhabhar and McEwen, 2001). Dans un second temps, sous l'effet des glucocorticoïdes, les lymphocytes et les monocytes migrent vers les ganglions lymphatiques et les muqueuses (de la peau, du tube gastro-intestinal, etc). Cette migration conduit à une diminution du nombre de lymphocytes et de monocytes et à une augmentation des polynucléaires dans le compartiment sanguin. Ce phénomène est transitoire et disparaît rapidement après la fin du stress (Dhabhar *et al.*, 1995). Cette redistribution des leucocytes leur permettrait d'être au bon endroit au bon moment pour faire face à une éventuelle agression microbienne associée au stress, par exemple au niveau de blessures cutanées. Cette mobilisation se fait évidement au détriment des compartiments désaffectés par les cellules immunitaires et est probablement en partie responsable de bon nombre de contradictions rapportées dans la littérature sur les effets tantôt immunosuppresseurs, tantôt immunostimulants du stress (Dhabhar and McEwen, 2001).

En situation de stress chronique, il est possible d'observer des altérations à long terme de la formule leucocytaire du sang ou de la rate. Ainsi, le stress social chronique accroît le poids de la rate, augmente son contenu en monocytes et neutrophiles et diminue le nombre de lymphocytes (Avitsur *et al.*, 2002b). Dans le sang, le stress social chronique augmente la proportion de granulocytes et diminue celle de lymphocytes (Stefanski, 1998). Il est possible que les lymphocytes s'accumulent dans la moelle osseuse (Stefanski *et al.*, 2003).

B. Augmentation de l'immunité acquise au niveau des muqueuses

Chez le rat, un stress aigu augmente l'immunité spécifique au niveau de la peau. Ceci a été montré pour la réponse cutanée d'hypersensibilité retardée (Dhabhar and McEwen, 1998). Le principe de l'hypersensibilité retardée consiste à sensibiliser un animal à un antigène lors d'une première injection, puis à effectuer une seconde injection par la voie sous-cutané environ une semaine plus tard. Cette seconde injection induit une forte réponse locale, appelée réponse d'hypersensibilité retardée (DTH). La DTH nécessite à la fois un processus inflammatoire et une réponse spécifique d'antigène impliquant des lymphocytes T mémoires. C'est une réponse de type Th1. Chez des rats préalablement sensibilisés pour un antigène, si l'on applique une contention de deux heures juste avant l'injection cutanée, on observe une induration cutanée et une infiltration leucocytaire accrues par apport aux animaux non stressés (Dhabhar and McEwen, 1998).

Dans le cas d'une sensibilisation à un produit irritant qui n'implique pas de réponse spécifique d'antigène, le stress n'augmente pas la réponse lors de la deuxième exposition (Dhabhar and McEwen, 1998). Cela signifie que le stress n'accroît pas la DTH en augmentant la réponse inflammatoire non-spécifique, mais en stimulant les lymphocytes mémoires pour l'antigène. Si l'on utilise des souris déficientes pour le gène de l'IFN-γ ou que l'on inhibe la cytokine par des anticorps, le stress n'a plus d'effet immunostimulant (Dhabhar *et al.*, 2000). La stimulation de la DTH par le stress est donc permise par une modulation de la production locale d'IFN-γ. Les catécholamines et les glucocorticoïdes sont impliqués puisque l'adrénalectomie supprime l'effet stimulant du stress sur la DTH et l'administration de faibles doses de catécholamines ou de glucocorticoïdes a le même effet stimulant que le stress (Dhabhar and McEwen, 1999). Un stress appliqué non plus au moment de la stimulation cutanée mais au moment de la sensibilisation augmente également la DTH (Wood *et al.*, 1993). En revanche, l'administration chronique de corticostérone à des rats, mimant un stress chronique, diminue la DTH (Dhabhar and McEwen, 1999).

Dhabhar et coll. ont rapporté un effet immunostimulant du stress sur la DTH chez le rat et chez la souris (Dhabhar and McEwen, 1998; Dhabhar *et al.*, 2000). Chez la souris, certains auteurs ont confirmé qu'un stress de contention juste avant l'injection cutanée augmente la DTH (Flint *et al.*, 2001). Au contraire, d'autres ont rapporté une inhibition de la DTH (Hosoi

et al., 1998). Une diminution de la DTH a été aussi décrite si la contention est appliquée avant l'étape de sensibilisation (Flint *et al.*, 2001; Kawaguchi *et al.*, 1997). La diminution de la réponse d'hypersensibilité est alors accompagnée d'un changement morphologique des cellules de Langerhans (les cellules dendritiques de la peau). Elles sont plus rondes, plus petites, ont des dendrites plus courts et présentent moins de molécules du CMH II que celles des animaux témoins (Hosoi *et al.*, 1998; Kawaguchi *et al.*, 1997). Après le stress, elles reprennent une morphologie normale en 24 heures et la DTH est restaurée dans le même délai.

Le stress aigu n'augmente pas la réponse à médiation cellulaire (de type Th1) au niveau de toutes les muqueuses. Dans les poumons, le stress semble plutôt favoriser la réponse humorale (de type Th2). Chez un individu normal, la réponse de la muqueuse pulmonaire à une stimulation antigénique est fortement inhibée afin d'éviter une obstruction pulmonaire. Chez le rat, si une session unique de chocs électriques est appliquée au moment d'une immunisation par la voie respiratoire, la production de toutes les classes d'immunoglobulines se trouve augmentée par rapport à des animaux non stressés (IgM, IgG, IgA et IgE). La réponse humorale est également augmentée lors d'une réponse de type secondaire (Persoons *et al.*, 1995).

C. Modulation de la réponse inflammatoire au niveau des différents tissus

1) Le stress induit la libération systémique de cytokines inflammatoires d'origine non-immune

Un stress aigu peut induire la production de médiateurs de l'inflammation et ce, en l'absence de stimulation immune. Ainsi, chez les rongeurs, des niveaux relativement élevés d'IL-6 peuvent être détectés dans la circulation sanguine à la suite d'un stress aigu (LeMay *et al.*, 1990; Nukina *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1993). Chez l'homme, un stress psychologique ou un exercice physique aigu sont en mesure d'augmenter les concentrations plasmatiques de l'IL-6 mais aussi du TNF-α et de l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (Drenth *et al.*, 1995; Owen and Steptoe, 2003; Steptoe *et al.*, 2001). Chez le rat, d'autres protéines de la phase aiguë telles que la protéine de transport des glucocorticoïdes (CBG), la glycoprotéine acide α1,

l'haptoglobine ou l'albumine sont aussi augmentées après une session de chocs électriques (Deak *et al.*, 1997).

La majorité des études se sont concentrées sur la production plasmatique d'IL-6. Son origine est encore mal déterminée. L'hypothèse selon laquelle l'IL-6 serait produite suite à une translocation bactérienne au niveau de la muqueuse intestinale (Ando *et al.*, 2000) est mise à mal par le fait que cette augmentation est aussi observée chez des animaux axéniques (Nukina *et al.*, 2001). L'hypophyse, les surrénales, la rate et les reins ne semblent pas être des sources significatives d'IL-6 en réponse au stress (Nukina *et al.*, 2001; Takaki *et al.*, 1994). Il a été proposé que la cytokine serait libérée par les cellules de Kuppfer situées au niveau du foie, en réponse à une stimulation sympathique (Kitamura *et al.*, 1997; Nukina *et al.*, 2001; Sheridan *et al.*, 1991; Takaki *et al.*, 1996). En réalité, il est probable que les sources soient multiples. Par exemple, les mastocytes sont aussi producteurs d'IL-6 lors du stress. Après un stress de contention, des souris déficientes en mastocytes ne présentent pas d'augmentation d'IL-6 plasmatique (Huang *et al.*, 2003). *In vitro*, les cellules endothéliales humaines libèrent de l'IL-6 en réponse à une stimulation par la noradrénaline ou l'adrénaline (Gornikiewicz *et al.*, 2000). Enfin, la masse musculaire est une source importante d'IL-6 lors d'un exercice physique et les cellules musculaires sont capables de libérer de l'IL-6 en réponse à une stimulation par le LPS (Febbraio and Pedersen, 2002; Frost *et al.*, 2002).

Les conséquences de la libération de cytokines inflammatoires lors du stress sont inconnues. Avec l'IL-1 et le TNF-α, l'IL-6 est l'une des principales cytokines responsables de la réponse de fièvre lors d'un processus inflammatoire (Lenczowski *et al.*, 1999; Netea *et al.*, 2000). Le stress induit une hyperthermie (Hashimoto *et al.*, 2001) et il est possible que l'IL-6 soit impliquée (Oka *et al.*, 2001). L'IL-6 pourrait aussi contribuer à maintenir la production hépatique de glucose, nécessaire à une activité musculaire prolongée (Febbraio and Pedersen, 2002). De ce point de vue, elle agirait donc en synergie avec les glucocorticoïdes.

2) Le stress augmente la réactivité inflammatoire des cellules immunitaires au niveau systémique

Stress aigu et chronique potentialisent fortement la libération de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF-α en réponse à une injection de LPS (Johnson *et al.*, 2002; Mekaouche *et al.*, 1994; Quan *et al.*, 2001). Cette hyper-réactivité inflammatoire est observée dans le compartiment sanguin, dans la rate et dans le foie. Elle est favorisée par l'apparition

de résistance aux glucocorticoïdes chez certaines cellules immunitaires (voir partie I.4.). La résolution de la réponse inflammatoire est alors plus difficile et la susceptibilité au choc septique s'en trouve accrue (Quan *et al.*, 2001).

3) Le stress diminue l'inflammation au niveau de la peau

Le stress module aussi la réponse inflammatoire au niveau des muqueuses. Il est notamment soupçonné d'augmenter les pathologies inflammatoires du tube digestif (Hart and Kamm, 2002). En revanche, le stress diminue la réponse inflammatoire de la peau (Campisi *et al.*, 2002; Mercado *et al.*, 2002a). Cet effet semble être à double tranchant. En réponse à une injection sous-cutanée *d'Escherichia coli*, des rats stressés par une session de chocs électriques atteignent plus rapidement le pic de la réponse inflammatoire locale. Ce pic est de plus faible amplitude que chez les animaux témoins et l'inflammation est plus rapidement résolue, sans que l'efficacité de la réponse contre la bactérie ne soit détériorée (Campisi *et al.*, 2002; Deak *et al.*, 1999). Il est possible que la résolution plus rapide de l'inflammation soit permise par élimination accélérée des bactéries, grâce à une stimulation des fonctions antimicrobiennes des cellules phagocytaires par le stress (voir paragraphe II.A).

En revanche, dans le cas d'une blessure ouverte, le stress retarde le phénomène de cicatrisation cutanée. Chez des souris soumises à un stress de contention chronique, les cinétiques de production d'IL-1β et du facteur de croissance des kératinocytes sont modifiées par rapport aux animaux témoins, avec un pic moins important le jour qui suit la blessure, mais une production plus longue dans le temps (Mercado *et al.*, 2002a). Ceci résulte en une cicatrisation plus lente (Mercado *et al.*, 2002b) et favorise donc le développement de bactéries opportunistes sur la plaie (Rojas *et al.*, 2002). La production accrue de NO au site d'inflammation chez les animaux stressés est peut-être responsable de l'inhibition de la réponse inflammatoire (Campisi *et al.*, 2002). En effet, le NO exerce des propriétés inhibitrices sur l'activité de cellules immunitaires, notamment sur les lymphocytes (Coussons-Read *et al.*, 1994).

Les conséquences du stress dépendent donc du compartiment auquel on s'intéresse (immunité systémique ou des muqueuses cutanée, pulmonaire ou digestive), et de la nature aiguë ou chronique du stress étudié (Fig. 4).

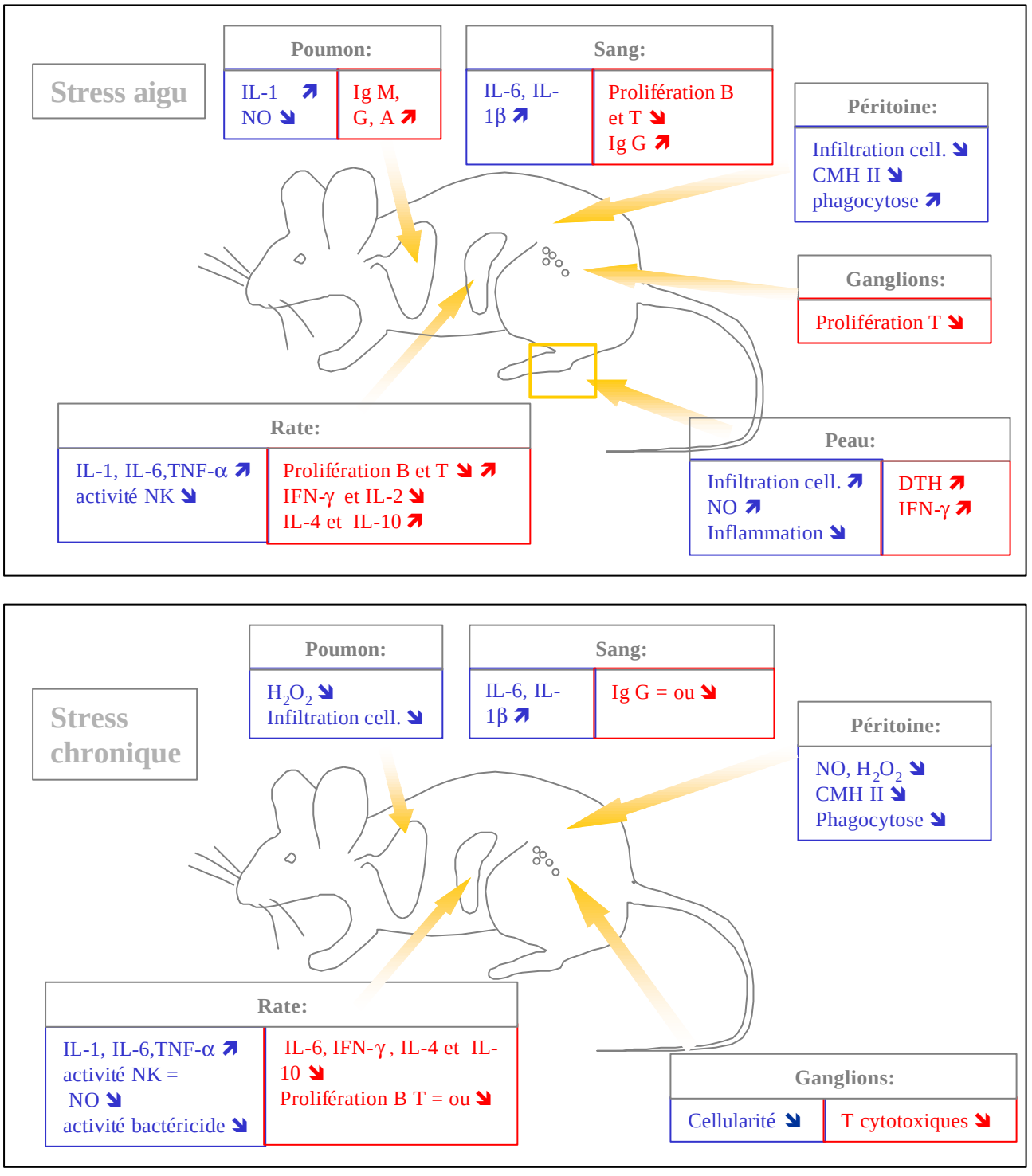


Figure 4: Effets du stress sur l'immunité innée et acquise.

Les données de la littérature sont très disparates. Les conséquences du stress sur le système immunitaire dépendent de l'espèce, du compartiment et de la chronicité du stress.

IV. Conséquences du stress sur la susceptibilité aux infections

Il est légitime de se demander si les effets du stress sur le système immunitaire sont adaptatifs. Dans le cas d'un stress aigu, l'augmentation de la réponse immunitaire au niveau de la peau semble effectivement adaptative face à une éventuelle infection cutanée. Cependant, nous avons vu que certains stress génèrent simultanément un état pro-inflammatoire au niveau systémique. Ceci peut être délétère si une infection survient par une autre voie que cutanée. De son côté, le stress chronique semble être à l'origine de dysfonctionnements du système immunitaire.

Plusieurs études ont tenté de relier les altérations immunologiques décrites ci-dessus avec la physiopathologie de maladies infectieuses. Le stress chronique a un effet immunosuppresseur sur la réponse immunitaire aux virus de la grippe et de l'herpès (Bonneau *et al.*, 1998; Brenner and Moynihan, 1997), à *Listeria Monocytogenes* (Cao *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1998) et aux mycobactéries (Brown and Zwilling, 1994). La majorité de ces études ont utilisé des chocs électriques ou une contention de 12 à 16 heures par jour pendant au moins 8 jours (Bonneau *et al.*, 1993; Brenner and Moynihan, 1997; Hermann *et al.*, 1993; Sheridan *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1998).

Le stress accroît la susceptibilité aux infections en affectant à la fois la réponse non spécifique et la réponse spécifique au pathogène. Dans la majorité des cas, le stress supprime la migration des leucocytes vers le site d'infection (Bonneau *et al.*, 1993; Hermann *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998). Une conséquence directe est l'inhibition de la réponse inflammatoire au lieu d'infection (Konstantinos and Sheridan, 2001; Sheridan *et al.*, 1991). Le stress inhibe aussi l'expression de molécules du CMH II par les macrophages en réponse à *L. Monocytogenes* ou à *Mycobacterium bovis* (Zhang *et al.*, 1998; Zwilling *et al.*, 1992) ainsi que l'activité bactéricide des macrophages (Brown and Zwilling, 1994). L'immunité acquise est également altérée. La génération de lymphocytes cytotoxiques spécifiques du virus de l'herpès est inhibée (Bonneau *et al.*, 1993). Une production de cytokines en faveur d'un profil Th2 a été observé en réponse à *L. Monocytogenes* (Zhang *et al.*, 1998), mais on observe le plus souvent une inhibition globale de la production de cytokines en réponse au pathogène, affectant à la fois les cytokines de type 1 et 2 (Brenner and Moynihan, 1997; Dobbs *et al.*, 1996).

Les conséquences de cette immunosuppression ne sont pas toujours délétères pour l'organisme. Le stress de contention est capable d'augmenter la charge virale ou bactérienne (Brenner and Moynihan, 1997; Brown *et al.*, 1993; Lawrence *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 1998) et de réactiver une infection latente virale ou mycobactérienne (Brown *et al.*, 1995b; Padgett *et al.*, 1998), mais il peut aussi améliorer les chances de survie en réponse à une forte dose infectieuse (Hermann *et al.*, 1993). Il est probable que dans ce dernier cas, le stress protège l'organisme en empêchant la réponse inflammatoire de s'emballer.

Sources de variabilité de la réponse au stress

Les conséquences du stress sur l'immunité semblent variables et parfois contradictoires. Ces contradictions peuvent parfois venir du fait que la notion de stress est beaucoup trop large et recouvre des situations extrêmement diverses. Le caractère potentiellement stressant d'un stimulus résulte de plusieurs facteurs. Il dépend de la nature de ce stress, mais aussi de la capacité de l'organisme à répondre de façon adaptée à ce stress. Cette aptitude dépend vraisemblablement de caractéristiques stables de l'animal (sa réactivité émotionnelle, la façon dont il perçoit et interprète les stimuli environnementaux) et de caractéristiques transitoires, liées à l'état de sensibilisation de l'organisme au moment où survient le stress.

I. Différences liées à la nature du stress

Hans Selye pensait que la réponse au stress est non spécifique. En effet, tout stress entraîne une activation de l'axe corticotrope et du système sympathique. Cependant, Pacák et Palkovits (2001) ont montré que l'activation endocrinienne et l'expression de la protéine Fos dans le cerveau sont très différentes selon qu'il s'agit d'un stress de contention, d'une hémorragie, d'une hypoglycémie, d'une exposition au froid ou à la douleur (Pacák and Palkovits, 2001). Il n'est pas surprenant que des agressions visant des variables physiologiques aussi importantes que la glycémie, la pression artérielle ou la température corporelle présentent des signatures neuroendocriniennes différentes.

Des stress essentiellement de nature psychologique (chocs électriques, contention, stress social) semblent également entraîner des réponses physiologiques différentes. Plusieurs critères de classification des facteurs de stress ont été dégagés, permettant d'expliquer cette variabilité (Fig. 5). Ainsi, les réponses comportementales et immunologiques à des chocs électriques sont beaucoup plus importantes si ces chocs sont inévitables que si l'animal a la possibilité de se mettre à l'abri (Mormède *et al.*, 1988; Palermo-Neto *et al.*, 2003). L'amplitude de la réponse de stress dépend aussi de la prédictibilité du facteur de stress (Mormède *et al.*, 1988; Pitman *et al.*, 1995).

L'exposition intermittente à un même type de facteur de stress (un stress homotypique) peut conduire à une diminution progressive des réponses comportementales, neuroendocrines et

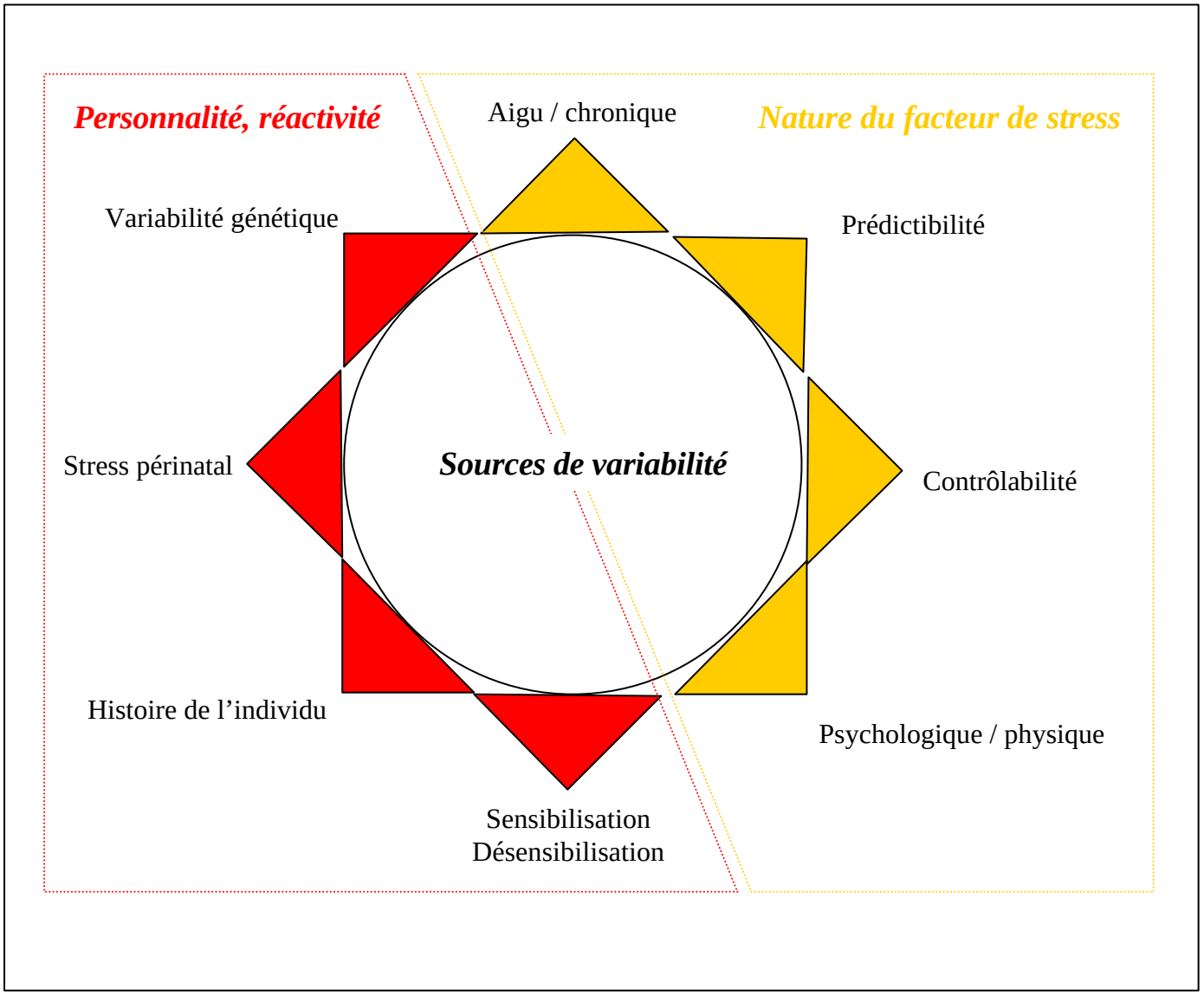


Figure 5: Sources de variabilité de la réponse au stress.

La variabilité peut être due à des caractéristiques propres à l'animal ou au facteur de stress.

immunologiques de l'organisme. Ce phénomène, communément appelé « habituation », peut être comparé au processus d'habituation à un stimulus sensoriel. Bien que l'habituation à un stress homotypique ne soit pas une règle (la réponse peut parfois ne pas changer ou même être augmentée), elle a été rapportée dans de nombreuses situations de stress et pour diverses variables physiologiques. Par exemple, l'activité cardiaque autonome en réponse à un conflit social diminue à chaque nouvelle rencontre chez les rats victorieux (Sgoifo *et al.*, 2001). L'augmentation des catécholamines plasmatiques en réponse à un stimulus sonore décroît avec les répétitions du stimulus (de Boer *et al.*, 1989). L'altération de la prolifération lymphocytaire induite par l'exposition à un bruit intense ou à des chocs électriques diminue à chaque répétition, et finit par disparaître (Lysle *et al.*, 1990; Sandi *et al.*, 1992).

II. Différences liées à l'individu

A. Traits de personnalité

Au sein d'une espèce, les individus diffèrent dans leur façon de répondre au stress. L'étude des différences interindividuelles est souvent abordée par une tentative de classification en différents « styles adaptatifs », incluant des paramètres psychologiques, comportementaux et plus rarement physiologiques. En psychologie humaine, des études épidémiologiques ont permis d'établir des corrélations entre le « style adaptatif » des individus, le niveau de stress perçu et quelques mesures immunitaires (Stowell *et al.*, 2001). D'après les critères de Rosenman et Friedman, il est possible de définir deux profils de réactivité comportementale dits A et B (Consoli, 1993). Les individu de type A (hyperactivité, impatience, précipitation) ont une réponse sympathique supérieure aux B lors d'un stress physique ou psychologique et présentent un risque de maladies cardiovasculaires supérieur aux B (Schroeder *et al.*, 2003).

Les travaux réalisés chez l'animal montrent que le « style adaptatif » n'est pas uniquement comportemental et psychologique, mais aussi physiologique (Koolhaas *et al.*, 1999). Chez le rat, les individus peuvent opter pour deux types de stratégie comportementale face à une situation stressante. L'attitude « proactive » correspond à des animaux qui présentent un comportement actif en essayant d'éliminer le facteur de stress. Les animaux proactifs sont agressifs. L'autre stratégie, dite «réactive », consiste à subir le stress de façon passive et correspond à des individus peu agressifs. Le choix de l'une de ces deux stratégies par l'animal est une caractéristique stable dans le temps et elle est très bien corrélée avec des critères

neuroendocriniens (tableau 1). Cependant, aucun des deux styles ne peut être qualifié de mieux adapté que l'autre à l'environnement : ils correspondent seulement à des stratégies différentes et, en fonction de la situation (stress évitable ou non, prévisible ou non), un style ou l'autre sera plus efficace (Koolhaas *et al.*, 1999).

Tableau 1 : profils de réactivité chez le rat, d'après les travaux de Koolhaas et al. (1999). HHS : axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien.

	Style Proactif	**Style Réactif**
Caractéristiques comportementales		
Latence d'attaque	faible	élevée
Evitement actif	élevé	faible
Développement de comportements routiniers	élevée	faible
Immobilité conditionnée	faible	élevée
Flexibilité	faible	élevée
Caractéristiques endocriniennes		
Activité de l'axe HHS	faible	élevée
Réactivité de l'axe HHS au stress	faible	élevée
Réactivité sympathique	élevée	faible
Réactivité parasympathique	faible	élevée
Testostérone plasmatique	élevée	faible

Une classification assez similaire a été développée chez le porc (tableau 2). Le principe consiste à maitenir le porcelet sur le dos. L'animal est classé comme «résistant » (R) ou « non-résistant » (NR) selon le nombre de tentatives que l'animal fait pour s'échapper. Les porcs classés R produisent plus de vocalisations et ont une activité cardiaque plus élevée lors d'un stress (Geverink *et al.*, 2002; Hessing *et al.*, 1993). Ils sont aussi plus agressifs que les NR (Hessing *et al.*, 1993). Une étude suggère que les styles NR et R sont associés à une réactivité immunitaire différente lors d'un stress (Hessing *et al.*, 1995). Le stress diminuerait d'avantage la prolifération lymphocytaire et la réponse humorale à un challenge antigénique chez les porcs R que chez les porcs NR.

Chez la souris, une classification basée sur des critères comportementaux complètement différents a été étudiée. La latéralisation cérébrale est corrélée à l'activité de différents systèmes physiologiques impliqués dans la réponse de stress (Neveu, 2003). La latéralisation est mesurée par l'utilisation préférentielle d'une patte pour la préhension de nourriture. Les souris de préférence « patuelle » droitière présentent un syndrome de maladie plus élevé que les gauchères en réponse à une injection d'IL-1. Elles montrent également une activité de

l'axe corticotrope et une réduction de la prolifération des lymphocytes T plus importantes après un stress (Neveu, 1996; Neveu, 2003).

Tableau 2 : profils de réactivité chez le porc, d'après les travaux (Geverink *et al.*, 2002; Hessing *et al.*, 1993; Hessing *et al.*, 1995; Ruis *et al.*, 2000).

	Style Résistant	**Style Non Résistant**
Caractéristiques comportementales		
Agressivité	élevée	faible
Evitement actif	élevé	faible
Latence d'exploration	faible	élevée
Activité locomotrice	=	=
Vocalisations lors d'un stress	élevées	faibles
Mamelles occupées par le porcelet	antérieures	postérieures
Caractéristiques endocriniennes		
Réactivité de l'axe HHS au stress	faible	élevée
Réactivité cardiaque au stress	faible	élevée
Caractéristiques immunitaires		
Réponse humorale	faible	élevée
Hypersensibilité retardée (DTH)	élevée	faible
Réduction de la DTH après stress	élevée	faible
Réduction de la prolifération des lymphocytes lors du stress	élevée	faible

L'ensemble de ces études permet de montrer que tous les individus ne sont pas égaux face au stress en terme de réponses comportementales et neuroendocriniennes. Ces inégalités sont en partie dues à des traits de personnalité stables dans le temps et repérables au moyen de tests comportementaux simples. Les études sur la latéralisation cérébrale montrent que ces styles comportementaux peuvent aussi permettre de prédire la réactivité à des stimuli immuns.

B. Statut social

Des caractéristiques environnementales telles que les liens sociaux au sein d'un groupe peuvent aussi influencer le type de réponse à une situation stressante (Ruis *et al.*, 2001; Sachser *et al.*, 1998). Dans ce cas, la classification n'est valable que dans le contexte social étudié et peut varier si l'animal est changé d'environnement. Le statut social résulte de l'interaction entre des caractéristiques propres à l'individu et les caractéristiques des autres membres du groupe dans lequel il se trouve (Drews, 1993). L'hypothèse selon laquelle le statut social d'un animal placé dans un groupe stable peut être utilisé comme prédicteur de sa

réponse à une modification de l'environnement a été testée chez les rongeurs comme chez le porc.

Chez les rongeurs, le statut social est corrélé à l'activité locomotrice (Vekovishcheva *et al.*, 2000), à l'agressivité (Blanchard *et al.*, 1988; Koolhaas *et al.*, 1997), à la réactivité émotionnelle (Aubert, 2001) et à des caractéristiques cognitives (Aubert, 2001; Barnard and Luo, 2002). En conditions stressantes, les dominants présenteraient une réponse majoritairement sympathique alors que les dominés auraient une réponse plutôt de nature corticotrope (Ely and Henry, 1978; Fokkema *et al.*, 1988; Fokkema *et al.*, 1995). Chez le porc, en situation de confrontation sociale, l'augmentation du rythme cardiaque et de l'activité de l'axe corticotrope est influencée par le rang social, mais le sens varie d'une étude à l'autre (de Jong *et al.*, 2001; Otten *et al.*, 1997).

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne l'influence du rang social sur la réactivité immunitaire. Chez la souris, le rang social semble affecter la croissance de tumeurs (Grimm *et al.*, 1996). Les dominés seraient plus susceptibles aux infections virales (Ebbesen *et al.*, 1991) et parasitaires (Schuster and Schaub, 2001). Chez le porc, une étude a montré que les dominés étaient plus susceptibles à une infection virale que les dominants (Hessing *et al.*, 1994). La résistance accrue des dominants était alors associée à une plus forte prolifération des lymphocytes en réponse aux antigènes viraux. Le rang social peut donc être une variable pertinente, surtout pour l'étude des répercussions d'un stress de nature sociale.

C. Origine des différences individuelles

1) Différences génétiques

Les différents profils de réactivité observés au sein d'une espèce ou au sein d'un groupe résultent de l'interaction entre des déterminismes d'origines génétique et épigénétique (Fig.5). L'implication de facteurs génétiques dans la variabilité individuelle est facilement mise en évidence en comparant entre eux différents groupes génétiquement homogènes. L'obtention de lignées consanguines chez les rongeurs est obtenue en effectuant des croisements entre frères et sœurs sur de nombreuses générations. Les lignées ainsi obtenues diffèrent très nettement dans leur réponse à de nombreux tests comportementaux, même si elles ont été élevées dans le même environnement (Mormède *et al.*, 2002). Des différences entre lignées ont aussi été observées au niveau de l'augmentation des glucocorticoïdes et des

catécholamines plasmatiques après divers stress chez la souris, le rat ou les oiseaux (Mormède *et al.*, 2002).

Les variations entre lignées se manifestent également au niveau de la susceptibilité à certaines infections. Par exemple, il existe des lignées de souris résistantes aux mycobactéries, dites BCG-résistantes (C3H/HeCr, A/J et DBA/2), et d'autres BCG-sensibles (B10.A, C57BL/6, BALB/c) chez qui la croissance bactérienne est beaucoup plus importante (Forget *et al.*, 1981). Ces différences immunitaires et neuroendocriniennes conduisent à une forte variabilité des conséquences que le stress peut avoir sur le système immunitaire. Ainsi, le stress de contention est capable de diminuer la résistance à une infection par des mycobactéries chez les souches BCG-sensibles, mais pas chez les BCG-résistantes (Brown *et al.*, 1993). Ou encore, l'augmentation de la réponse humorale par le stress est observée chez les souris BALB/cByJ mais pas chez les C57BL /6J (Shanks and Kusnecov, 1998).
Il est possible de sélectionner spécifiquement des lignées pour un critère comportemental donné. Ainsi, Benus et coll. ont créé des lignées de rongeurs agressifs et non agressifs en sélectionnant les mâles selon la durée de la latence d'attaque lorsqu'un animal étranger est introduit sur leur territoire (Benus *et al.*, 1991). Les souris et les rats SAL (latence d'attaque courte) présentent un profil de réactivité proactif, alors que les LAL (latence d'attaque longue) montrent un profil de type réactif (Koolhaas *et al.*, 1999). La réactivité et la vulnérabilité au stress sont donc sous le contrôle de facteurs génétiques.

Une autre source de variabilité génétique est liée au sexe. Ces différences s'expriment notamment au niveau de la réactivité comportementale dans différentes situations anxiogènes utilisées pour mettre au point des modèles animaux d'anxiété ou de dépression (Palanza, 2001). Par exemple, la réponse comportementale de rats à une session de chocs électriques dépend de leur sexe : les femelles semblent moins affectées que les mâles (Steenbergen *et al.*, 1989). Le sens de ces différences varie selon le modèle utilisé. Notons cependant que les modèles de stress social chronique sont obtenus à partir d'animaux mâles, alors qu'il est très difficile d'obtenir de fortes relations de dominance ou de hauts niveaux d'agressivité chez les femelles (Palanza, 2001).

2) Histoire de l'individu

Stress périnatal

Les facteurs épigénétiques pouvant intervenir dans l'ontogenèse de la personnalité sont multiples. Un nombre croissant d'études témoigne de l'importance de l'environnement périnatal sur le développement du fœtus et ou du nouveau-né dans les espèces mammifères. Les agressions subies par l'animal lors de la période périnatale peuvent avoir des conséquences à long terme sur son développement endocrinien, immunitaire ou comportemental. Le stress prénatal entraîne des retards moteurs chez le jeune, réduit le comportement exploratoire, affecte les capacités d'apprentissage et augmente l'émotivité des animaux (Braastad, 1998). L'exposition à des doses élevées de glucocorticoïdes d'origines maternelle ou pharmacologique est associée à une réactivité accrue de l'axe corticotrope chez le jeune mais aussi chez l'adulte (Maccari *et al.*, 2003; Matthews, 2002). Chez ces individus, la réponse endocrinienne à un stress est plus importante (en amplitude et /ou en durée) que celle développée par des individus n'ayant pas été exposés à des glucocorticoïdes pendant leur développement fœtal. Cette réactivité accrue est en partie due à une altération du rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope. Les fœtus femelles semblent plus susceptibles au stress prénatal que les mâles (Matthews, 2002). Des études chez les rongeurs et chez les primates ont également montré que le stress périnatal affecte le fonctionnement du système immunitaire en conditions basales et en situation de stress (Fonseca *et al.*, 2002; Kay *et al.*, 1998).

L'état d'activation des systèmes neuroendocrinien et immunitaire

Quand l'ontogenèse des systèmes neuroendocrinien et immunitaire est achevée, certains événements peuvent encore modifier la réactivité au stress. Contrairement aux stress pré- et péri- nataaux, ces effets sont généralement transitoires. L'influence réciproque entre stress et réactivité inflammatoire est sujette à un nombre croissant d'études. Par exemple, chez le rat un challenge inflammatoire (injection de LPS ou d'IL-1) peut sensibiliser pour plusieurs semaines l'axe corticotrope. Lorsque l'on stimule à nouveau l'animal avec un stimulus de nature inflammatoire (IL-1) ou non inflammatoire (flash lumineux), les réponses de l'ACTH et de la corticostérone sont augmentées par rapport aux animaux n'ayant pas subi de challenge inflammatoire (Schmidt et al., 1995; Weidenfeld and Yirmiya, 1996). Cette sensibilisation de l'axe corticotrope est en partie permise par un accroissement de la synthèse et du stockage de

la vasopressine dans les neurones producteurs de CRH de l'hypothalamus. Lors d'un nouveau stress, la vasopressine est libérée en même temps que le CRH et agit en synergie sur la libération d'ACTH (Schmidt et al., 1996; Tilders and Schmidt, 1999). De plus, le stimulus inflammatoire réduit la sensibilité de l'axe corticotrope au rétrocontrôle négatif des glucocorticoïdes, accentuant d'autant plus le phénomène de sensibilisation (Weidenfeld and Yirmiya, 1996).

De façon réciproque, les chocs électriques ou la défaite sociale augmentent la sensibilité du système immunitaire à un challenge inflammatoire ultérieur (Johnson *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2003; Quan *et al.*, 2001). Cet accroissement de la réponse inflammatoire est permis par une diminution de la sensibilité des cellules immunitaires à l'inhibition par les glucocorticoïdes (Stark *et al.*, 2001). Ici encore, le rétrocontrôle des glucocorticoïdes sur l'axe corticotrope est altéré (O'Connor *et al.*, 2003).

En revanche, l'interaction entre stress psychologique et immunité spécifique d'antigène a été très peu étudiée. Par exemple, on ne sait pas si l'engagement dans une réponse spécifique d'antigène modifie la réactivité ultérieure à un stress de nature psychologique. De même, on ne sait pas si un stress psychologique antérieur peut sensibiliser ou désensibiliser le système immunitaire à une future stimulation antigénique puisque la plupart des études sur la réponse spécifique d'antigène utilisent soit un stress aigu appliqué dans une fenêtre de temps très étroite autour de la date de vaccination (Kusnecov and Rabin, 1993; Lawrence *et al.*, 2002; Moynihan *et al.*, 1990; Zalcman *et al.*, 1988), soit des stress de nature chronique débutant également au même moment que le challenge immunitaire (Brenner and Moynihan, 1997; Sheridan *et al.*, 1991; Weatherby *et al.*, 2003).

Objectifs de la thèse

Justification des objectifs

De plus en plus de données expérimentales et épidémiologiques soutiennent l'idée que l'environnement social contribue largement au développement et à l'expression de maladies chez l'homme comme chez l'animal (pour revue, Bohus and Koolhaas, 1991). Ces maladies peuvent concerner le système cardiovasculaire (hypertension, arythmies), l'humeur et la motivation (dépression, anxiété) et le système immunitaire (maladies autoimmunes, infections virales ou bactériennes, ulcères, croissance tumorale). Alors que nombre de stress utilisés en laboratoire (chocs électriques, rotation, bruit, immersion dans l'eau froide, contention, immobilisation) ont peu de rapport avec les agressions qu'un animal peut rencontrer « naturellement », les stress associés à l'environnement social sont des événements fréquents aussi bien dans la nature qu'en laboratoire ou en élevage.

⇒ L'objectif général de cette thèse est de préciser dans quelle mesure l'environnement social influence le fonctionnement du système immunitaire.

Les travaux ont été réalisés chez le porc, puis la souris, avec des animaux sevrés et logés en groupe. L'environnement social étudié est donc celui formé par les relations entre congénères d'âge similaire et ne concerne pas la relation mère jeune.

I. Environnement social stable

Dans les espèces sociales, la composition du groupe et sa structure déterminent le mode de vie de chacun tant au niveau de l'occupation du territoire que de l'accès aux ressources alimentaires ou à la reproduction (Koyama and Kamimura, 2000; Oakeshott, 1974). La taille du groupe, la surface du territoire et sa diversité déterminent fortement le type de structure sociale adoptée (Haemisch *et al.*, 1994; Van Loo *et al.*, 2001). La structure sociale confère une prédictibilité aux interactions sociales. Lorsque deux individus du groupe se rencontrent, le type d'interaction pouvant avoir lieu est prédéterminé par le rang de chacun. De plus, un environnement stable peut temporiser le stress associé à de nombreux événements perturbants en fournissant ce que l'on appelle un « soutient social ». Le rôle bénéfique de la présence de congénères connus pendant ou juste après la survenue d'un événement stressant a été démontré dans de nombreuses espèces (Bartolomucci *et al.*, 2003; Ruis *et al.*, 2001).

Selon l'espèce et le type de structure sociale, il semble qu'occuper un rang de dominé ne soit pas nécessairement une situation stressante (Abbott *et al.*, 2003; Creel, 2001). Chez les rongeurs, les primates ou le porc, le fonctionnement du système neuroendocrinien est influencé par le statut social (voir Introduction Générale). Il est probable que ces différences influencent le fonctionnement du système immunitaire. Les différences de susceptibilité entre dominants et dominés relevées pour certaines maladies renforcent cette hypothèse (Ebbesen *et al.*, 1991; Grimm *et al.*, 1996; Hessing *et al.*, 1994; Schuster and Schaub, 2001), mais les bases immunitaires de ces observations n'ont pas été explorées. Pour comprendre comment l'environnement social affecte la résistance aux maladies, il est nécessaire de déterminer au niveau de quelles variables immunitaires s'expriment d'éventuelles différences entre catégories sociales.

II. Environnement social instable

La perturbation de la structure sociale est une source de stress importante. Expérimentalement, l'instabilité sociale peut être créée par une situation de surpeuplement dans un espace limité. Mais le plus souvent, le stress est provoqué en regroupant des individus étrangers sur un même territoire. L'échange d'actes agressifs permet aux nouveaux partenaires de définir leur position hiérarchique les uns par rapport aux autres. L'ensemble des procédures induisant de l'instabilité sociale en regroupant des individus étrangers sera par la suite désigné sous le terme général de « stress social ».

A. Conséquences endocriniennes

Koolhaas et al (1997) ont mis l'accent sur le fait que la défaite sociale entraîne une réponse neuroendocrinienne particulièrement forte par rapport à d'autres stress, que ce soit en conditions aiguës ou chroniques. La comparaison des réponses à différents types de stress aigus (nage forcée, contention, chocs électriques de différentes intensités, changement de cage, bruit, etc) a montré que la défaite sociale apparaît comme étant le stress augmentant le plus l'adrénaline et le cortisol plasmatiques (Koolhaas *et al.*, 1997). De plus, elle entraîne une réponse cardiovasculaire différente des autres stress. Un stress de contention augmente de façon similaire l'activité des branches sympathique et parasympathique du système autonome et mène à une simple augmentation du rythme cardiaque. Il semble en aller de même lorsqu'un rat dominant est confronté à un animal de rang inférieur. En revanche, lorsque deux

animaux de même rang social se confrontent, l'activité sympathique augmente beaucoup plus fortement que l'activité parasympathique, ce qui conduit à des arythmies (Sgoifo *et al.*, 1999).

En conditions chroniques, la corticostérone peut cesser de répondre ou au contraire augmenter au cours du temps selon le modèle de stress et l'espèce utilisés (Keeney *et al.*, 2001; Stefanski, 2000). Chez le rat, les réponses de la noradrénaline et de l'adrénaline plasmatiques restent élevées (Stefanski, 2000). La réactivité autonome cardiaque présente un phénomène d'habituation chez les dominants mais pas chez les dominés (Sgoifo *et al.*, 2001). Enfin, l'atténuation de la rythmicité circadienne de l'activité cardiaque et de la température est plus marquée en réponse à un stress social qu'à un stress non-social (Sgoifo *et al.*, 2002).

B. Conséquences immunitaires

Le stress social, et plus particulièrement la défaite sociale, modifient la réactivité du système immunitaire. Que ce soit chez les rongeurs ou chez le porc, le sens de ces modifications est variable.

Chez le rat, l'altération de la formule sanguine en réponse à la défaite sociale chronique a été largement décrite. Alors que les proportions de lymphocytes B et de NK restent relativement constantes, on observe une augmentation des granulocytes et une chute du pourcentage de lymphocytes T CD4 et CD8 (Stefanski, 1998; Stefanski and Engler, 1999). Une involution thymique est également observée (Klein *et al.*, 1992; Raab *et al.*, 1986). Les effets de la défaite sociale sur la prolifération lymphocytaire sont contradictoires. Selon les études, la prolifération en réponse à des mitogènes lymphocytaires est diminuée (Raab *et al.*, 1986), inchangée (Klein *et al.*, 1992) ou augmentée (Bohus *et al.*, 1993).

Chez la souris, les conséquences d'un stress social chronique sur la prolifération des lymphocytes sont également controversées. Il a été rapporté que la prolifération des lymphocytes spléniques en réponse à la concanavaline A ou au LPS peut être soit inhibée (Bartolomucci *et al.*, 2001; Dréau *et al.*, 1999; Hardy *et al.*, 1990), soit stimulée (Cacho *et al.*, 2003). Certaines procédures de stress social stimulent la réactivité inflammatoire. Ainsi, le modèle de défaite sociale répétée utilisé par l'équipe de Sheridan exacerbe la production de cytokines inflammatoires en réponse à une injection de LPS par les cellules du foie, des poumons et de la rate (Quan *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 2001). Enfin, le stress social inhibe la réponse spécifique d'antigène (de Groot *et al.*, 1999; de Groot *et al.*, 2002). Généralement, les

effets du stress sont plus marqués chez les souris qui ont été blessées ou ont perdu leur statut de dominantes pendant le stress (Bartolomucci *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 1990).

Chez le porc, l'altération de la formule sanguine en réponse à un regroupement d'animaux est similaire à ce qui est observé chez le rat. Le pourcentage de granulocytes augmente et celui des lymphocytes diminue (Ruis *et al.*, 2001). La prolifération des cellules mononucléées sanguines en réponse à la Con A, à la PHA et au PWM est diminuée pendant au moins trois semaines (Deguchi and Akuzawa, 1998). Il semble en fait que la prolifération ait tendance à augmenter chez les vainqueurs et à diminuer chez les perdants (Tuchscherer *et al.*, 1998). Le stress social inhibe enfin la réponse spécifique d'antigène. Chez des porcs mâles, un changement de groupe trois jours après une vaccination intramusculaire contre le virus de la rage diminue le développement de l'immunité spécifique parmi les lymphocytes sanguins mais n'a pas de conséquences à long terme sur la susceptibilité à l'infection (de Groot *et al.*, 2001).

C. Importance de la défaite ou de la victoire

Il ressort de ces études que le stress n'est pas le même selon que l'animal sort vainqueur ou perdant de la confrontation sociale. Les répercussions physiologiques de ces deux situations sont différentes et durent plus longtemps chez les perdants. Chez le rat, l'animal dominé perd du poids et présente une activité des glandes surrénales accrue par rapport au dominant (Raab *et al.*, 1986; Stefanski, 2000; Stefanski, 2001). En situation de stress chronique, la réponse cardiaque du dominé reste similaire à chaque rencontre, alors que celle du dominant diminue au fur et à mesure des rencontres (Sgoifo *et al.*, 2001). La formule sanguine du dominant n'est altérée que de façon transitoire, mais le dominé continue de présenter un pourcentage de granulocytes sanguins supérieur à la normale après 7 jours de cohabitation (Stefanski and Engler, 1999). De plus, la prolifération des lymphocytes spléniques en réponse à la concanavaline A est diminuée chez les dominés en comparaison des dominants (Hardy *et al.*, 1990; Raab *et al.*, 1986). Chez le porc, les dominants présentent également une réponse proliférative supérieure (Tuchscherer *et al.*, 1998). En revanche, la réponse humorale de souris immunisées un jour après un regroupement semble plus importante chez les dominés que chez les dominants (Fauman, 1987). D'après ces études, il est difficile de dire si défaite et victoire représentent différents niveaux d'intensité d'un même et unique stress ou bien des

stimulations de nature différente, la victoire étant plutôt considérée comme une récompense alors que seule la défaite serait un « vrai » stress.

Objectifs de la thèse

I. Influence du statut social sur les systèmes neuroendocrinien et immunitaire

Nous venons de voir que l'environnement social est en mesure d'affecter le fonctionnement des systèmes neuroendocrinien et immunitaire en conditions sociales stables et en situation d'instabilité. Cette influence semble dépendre du statut social occupé par l'individu. Nous avons tenté de dissocier l'influence du statut social dans un environnement stable de celle dans une situation de confrontation sociale, mais dans la littérature, cette distinction n'est généralement pas clairement faite. Pourtant la signification du statut est assez différente dans ces deux situations. Le statut à l'issue d'une confrontation sociale sépare les individus en deux catégories pour lesquelles la signification du regroupement aura été différente. Dans un groupe stable, le statut social est un état chronique et l'existence d'un stress pour l'une ou l'autre des catégories sociale n'est pas évidente. La confusion entre le statut social –état et le statut social –stress contribue probablement à l'absence de conclusions claires quant à l'influence du statut social sur les réactivités neuroendocrinienne et immunitaire. La signification du statut social en terme de stress (être dominé ou dominant est-il stressant ?) et en terme de réactivité immunitaire (dominants et dominés ont-ils une réactivité différente aux agressions environnementales ?) est donc à préciser.

➢ Q1 : Comment le fonctionnement des systèmes neuroendocrinien et immunitaire est-il influencé par le statut social

- dans un groupe hiérarchiquement stable ?

- en condition d'instabilité sociale ?

II. Conséquences neuroendocriniennes et immunitaires de l'instabilité sociale

Après avoir répondu à cette première question, nous tenterons de préciser de quelle manière l'environnement social influence le système immunitaire et quelles en sont les conséquences. Pour cela, nous nous intéresserons à une situation où, d'après la littérature, les effets de l'environnement social sont les plus marqués, c'est-à-dire une situation de défaite sociale. Le stress de défaite sociale est capable d'augmenter la réactivité inflammatoire des cellules immunitaires (Quan *et al.*, 2001). En revanche, l'effet de la défaite sociale sur la balance Th1/Th2 n'a pas été clairement étudié. Dans la littérature, aucune donnée ne permet de savoir si l'effet pro-inflammatoire d'un stress est associé à une déviation de la balance Th1/Th2.

Les conséquences d'un stress social sur la susceptibilité aux infections sont également mal connues. Des modèles de stress social chronique débutant avec l'infection augmentent la croissance virale chez le poulet (Mohamed and Hanson, 1980) et chez la souris (Sheridan *et al.*, 2000). Le stress social semble également en mesure de réactiver une infection latente par le virus de l'herpès (Padgett *et al.*, 1998). D'après la théorie de la balance Th1/Th2, l'accroissement de la susceptibilité aux infections par le stress devrait être associé à un profil de type Th2, mais cela n'a pas été vérifié dans ces études-ci.

➢ Q2: Comment l'instabilité sociale influence-t-elle la production de cytokines de type inflammatoire, Th1 et Th2 ? Quelles en sont les conséquences en terme de développement de l'immunité spécifique et de résistance à une infection ?

III. Sources de variabilité dans la réponse au stress social

Dans la littérature, les effets immunitaires du stress social sont disparates. De plus, la variabilité individuelle est très importante en réponse à des situations de stress social. Il semblait donc pertinent de rechercher quels facteurs, propres à l'individu ou au stress, sont capables de moduler les conséquences immunitaires du stress social. Etant donné le temps imparti à la thèse, nous nous sommes donné pour objectif de mettre en évidence certains facteurs potentiellement importants sans chercher à approfondir les mécanismes sous-jacents.

Les différences d'origine génétique ou liées aux « styles adaptatifs » comme source possible de variabilité interindividuelle lors du stress ont été largement étudiées (voir introduction générale). En revanche, l'influence de facteurs qui ne sont pas liés à des caractéristiques stables de l'individu mais liés à son histoire récente l'ont été beaucoup moins. Or il est probable que l'histoire sociale de l'individu module sa réactivité à un challenge social. Peu de données concernent également l'effet d'interaction entre une stimulation préalable du système immunitaire et la survenue ultérieure d'un stress psychologique sur la réactivité immune (voire introduction générale). Or, le stress ne survient pas toujours sur un animal dont le système immunitaire est « au repos ». C'est par exemple le cas lorsque l'on étudie l'effet du stress chez un animal préalablement infecté par un virus ou une bactérie ou lorsque l'on étudie les conséquences d'un stress social chronique : à chaque nouvelle confrontation sociale, le stress psychologique se surajoute au stress immun causé par les blessures des sessions de stress précédentes. Ceci introduit une autre source de variabilité très peu étudiée jusqu'ici que sont les effets somatiques liés à la composante physique de certains stress. Or dans le cas du stress social, ces effets « collatéraux » sont probablement très importants : ils sont liés aux blessures et à l'activité physique intense fournie pendant les combats.

- Q3 : Quelles sont les caractéristiques de l'individu ou du facteur de stress capables d'influencer la nature et l'amplitude des altérations immunes observées après une défaite sociale ?

Présentation des modèles utilisés

La première étape de cette thèse a été de choisir les modèles de stress et d'infection permettant de répondre aux objectifs posés. Il a ensuite été nécessaire de valider ces modèles. Dans le cas du modèle de stress social choisi, il s'agissait de vérifier que nous retrouvions les effets rapportés dans la littérature. Dans le cas du modèle infectieux, il a fallu décrire les cinétiques d'infection et de développement de la réponse immunitaire spécifique du pathogène.

I. Le modèle de défaite sociale chronique

Chez la souris, un modèle de défaite sociale chronique a été utilisé. La procédure de stress, nommée « social disruption » (SDR), a été décrite précisément dans la littérature (Quan *et al.*, 2001; Stark *et al.*, 2001). Le stress consiste en six sessions réparties sur une semaine (3 jours avec stress, un jour sans, puis trois nouveaux jours de stress). Lors d'une session, un mâle agressif (dit « intrus ») est introduit dans la cage d'un groupe de souris (dites « résidentes ») pendant deux heures. Les intrus sont des souris plus âgées (4 à 6 mois), donc beaucoup plus lourdes, rendues agressives par un logement individuel depuis au moins un mois. Typiquement, un intrus attaque et soumet rapidement tous les résidents puis continue à les menacer et à les mordre jusqu'à la fin de la session. Si l'intrus ne parvient pas à soumettre les résidents rapidement, il est remplacé par un nouvel animal. Afin que l'agressivité de l'intrus ne décroisse pas au fur et à mesure des sessions, celui-ci est renouvelé chaque jour. Ce stress provoque des blessures cutanées nombreuses et de sévérité très variable selon les individus.

Cette procédure présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle diminue la variabilité de la réponse au stress en induisant systématiquement une défaite chez tous les sujets expérimentaux (l'intrus n'est pas étudié). Ensuite, ses effets sur le système immunitaire sont marqués et favorisent clairement un état pro-inflammatoire. La stimulation des splénocytes issus de ces souris révèle une production accrue d'IL-6 (Stark *et al.*, 2001). Les animaux recevant une injection de LPS à la fin d'une semaine de SDR présentent une réponse inflammatoire exacerbée dans le foie, les poumons et la rate. Leur pourcentage de survie après l'injection de LPS est réduit par rapport aux animaux qui n'ont pas subi le stress social (Quan *et al.*, 2001). C'est avec ce modèle qu'il a été montré pour la première fois qu'un stress

pouvait induire un phénomène de résistance aux glucocorticoïdes des cellules spléniques (Stark *et al.*, 2001).

L'équipe ayant décrit le SDR s'est concentrée sur l'étude des mécanismes d'induction de la résistance aux glucocorticoïdes dans les macrophages mais n'a pas du tout étudié les effets de ce stress sur les lymphocytes et sur l'immunité acquise. Les données de la littérature ne permettent pas de déterminer si le SDR induit bien une modification de la balance Th1/Th2 : les cytokines responsables de l'inflammation de type allergique, favorisant une orientation Th2 (IL-4 ou l'IL-13) ou de type bactérien, favorisant un profil Th1 (IFN-γ), n'ont pas été recherchées dans ce modèle. L'utilisation du modèle SDR devrait permettre de déterminer si un stress ayant un effet pro-inflammatoire modifie aussi la balance Th1/Th2 et affecte la résistance à une infection virale ou bactérienne.

II. Le modèle infectieux BCG

A. Présentation du modèle

Pour étudier les conséquences du stress social sur la susceptibilité à une infection de type viral ou microbien, nous avions besoin d'un modèle présentant plusieurs caractéristiques précises. Le modèle infectieux devait avoir été bien décrit au niveau immunitaire et nécessiter clairement une réponse Th1. De plus, il devait être d'utilisation sûre pour l'homme et non transmissible par voie naturelle d'un animal à l'autre, pour pouvoir être utilisé dans un laboratoire disposant d'animaleries et d'un équipement de laboratoire conventionnels.

Les mycobactéries, dont le bacille de Calmette et Guérin (BCG) fait partie, sont des pathogènes intracellulaires qui se développent dans les macrophages. L'acquisition d'une immunité spécifique est permise par le développement de lymphocytes Th1, dont l'importante production d'IFN-γ permet l'activation des macrophages (Flynn and Chan, 2001; Orme *et al.*, 1993). Ceux-ci éliminent la bactérie en libérant des produits bactéricides tels que le NO (Flesch and Kaufmann, 1991). Certaines lignées de souris sont dites BCG-sensibles (Balb/cJ, C57Bl/6, B10.A), parce qu'elles ont plus de difficultés à enrayer la croissance de la bactérie que les lignées dites BCG-résistantes (Forget *et al.*, 1981). Cette différence de susceptibilité entre lignées se retrouve pour les infections par *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium lepraemurium* ou L*eishmania donovani* et est due à la présence du gène de résistance

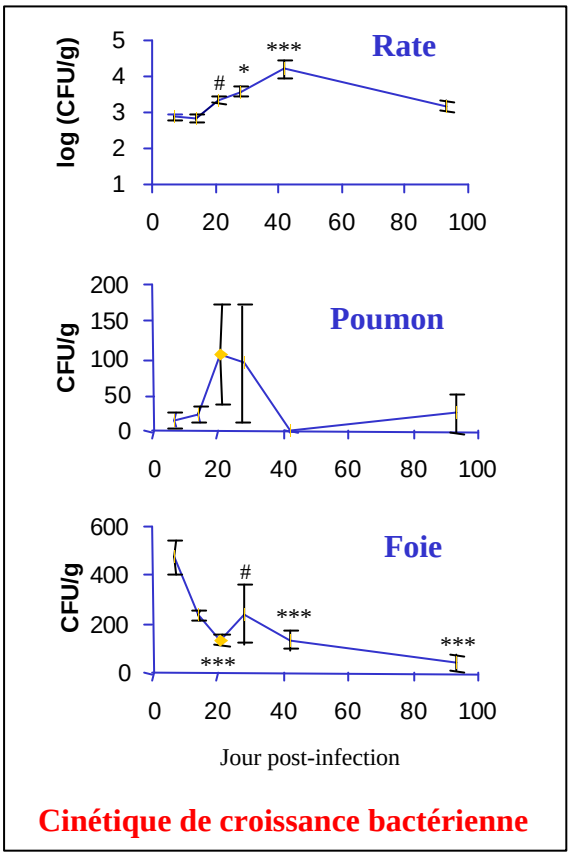
Nramp1. Ce gène code pour une protéine de membrane exprimée dans le lysosome des macrophages et s'oppose à la multiplication intracellulaire des bactéries (Gruenheid and Gros, 2000). Les macrophages des lignées résistantes au BCG (C3H/HeCr, A/J, DBA/2) éliminent rapidement la mycobactérie et le développement d'une forte réponse spécifique n'est pas nécessaire. Au contraire, les lignées sensibles développent lentement une réponse spécifique qui s'amplifie au fur et à mesure que la charge bactérienne augmente (Pelletier *et al.*, 1982). Lignées résistantes et sensibles diffèrent par leur production de cytokines en réponse à la bactérie. Alors que les souches résistantes produisent rapidement de l'IFN-γ, de l'IL-6, de l'IL-2 et du TNF-α, les souches sensibles produisent ces cytokines en faibles quantités, mais libèrent parfois aussi de l'IL-4 (Huygen *et al.*, 1992; Roch and Bach, 1991).

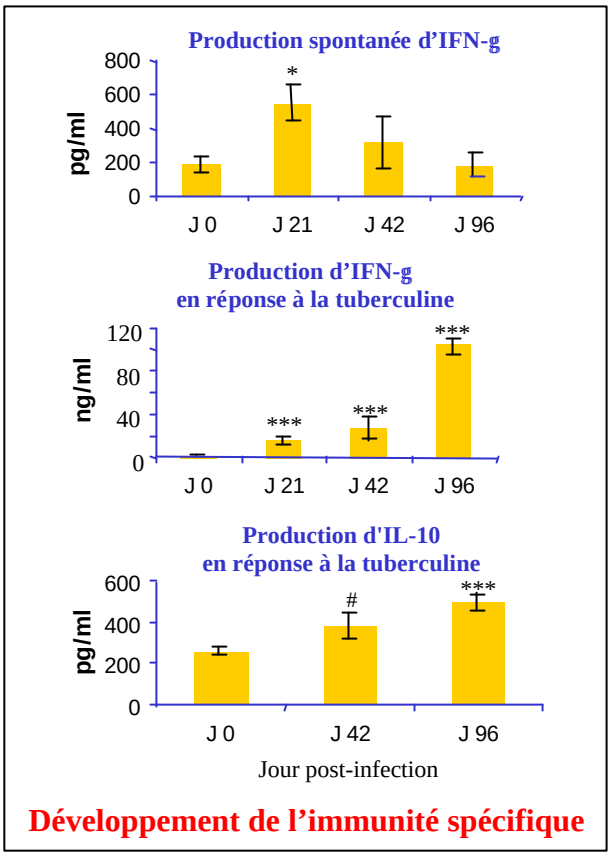
L'utilisation du modèle infectieux BCG présente les avantages requis. Tout d'abord, en nécessitant une réponse de type Th1, ce peut-être un bon modèle pour étudier l'influence du stress sur la balance Th1/Th2. De plus, il a été montré qu'un stress de contention chronique est capable d'altérer la résistances aux mycobactéries chez des lignées de souris BCG-sensibles, mais pas chez les BCG-résistantes (Brown *et al.*, 1995b). L'équipe de Brown s'est attachée à déterminer si la contention chronique augmente la susceptibilité aux mycobactéries en affectant l'activité antimicrobienne des macrophages. La contention diminue l'expression des molécules Ia du CMH et la production de TNF-α et de NO par les macrophages à la fois chez les lignées de souris résistantes et sensibles. Malgré la similitude des effets du stress sur les macrophages dans les deux lignées, seules les souches BCG-sensibles présentent au final des macrophages dont l'activité anti-mycobactérienne est affectée par le stress (Brown *et al.*, 1993). La corticostérone joue probablement un rôle prépondérant dans la sensibilité à la bactérie puisque seuls les macrophages issus de souris sensibles sont affectés par les glucocorticoïdes *in vitro* (Brown *et al.*, 1995a) et que l'administration *in vivo* de l'antagoniste des glucocorticoïdes RU486 bloque les effets du stress de contention sur les macrophages des souris BCG-sensibles (Brown and Zwilling, 1994). Le stress de contention est aussi capable de réactiver une infection mycobactérienne latente (Brown *et al.*, 1995b). L'implication des lymphocytes et de l'immunité acquise n'a pas été étudiée dans ce modèle.

B. Etudes préliminaires

Les bactéries BCG viables ont été obtenues à partir de la reconstitution de vaccin BCG Aventis Pasteur intradermique. Une dose infectieuse faible a été choisie (1000 CFU par

animal) afin d'obtenir une cinétique d'infection la plus courte possible. L'injection a été réalisée par voie intraveineuse. Les cinétiques de croissance de la bactérie dans la rate, les poumons et le foie sont présentées Fig. 6. Le développement de la réponse spécifique contre la bactérie a été évalué en mesurant la production d'IFN-γ et d'IL-10 par les splénocytes mis en culture en présence ou non de tuberculine (Fig.6). Une réponse spécifique anti-tuberculine est nettement observable dès 3 semaines après l'infection et atteint un maximum en fin de cinétique.





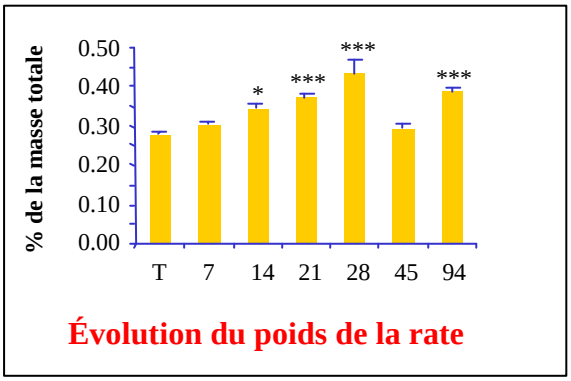


Figure 6: Cinétique d'infection par 1000 CFU de BCG et développement de la réponse spécifique des splénocytes chez la souris Balb/c.

Les tests statistiques correspondent au test de Dunnett, comparant chaque jour avec avec le jour 7 pour les CFU et avec le groupe témoin (jour 0) pour les autres variables. (# P<0.1, * P<0.05, *** P<0.001)

Résultats

Nous avons tenté de répondre aux objectifs fixés en réalisant les travaux suivants (Fig.7) :

➢ Q1 : Comment le fonctionnement des systèmes neuroendocrinien et immunitaire est-il influencé par le statut social

- dans un groupe hiérarchiquement stable ?

- en condition d'instabilité sociale ?

L'influence de la victoire ou de la défaite sur réponse au stress social a été étudiée chez le porc à l'issue d'un unique regroupement (1er chapitre).

Dans un environnement social stable, nous avons tenté de déterminer si le statut social d'un animal influence sa réactivité endocrinienne et immunitaire. L'effet du statut a été testé chez la souris, en conditions basales ainsi que dans le contexte d'une infection par le BCG (4ème chapitre).

➢ Q2: Comment l'instabilité sociale influence-t-elle la production de cytokines de type inflammatoire, Th1 et Th2 ? Quelles en sont les conséquences en terme de développement de l'immunité spécifique et de résistance à une infection ?

Les effets de la défaite sociale sur la capacité du système immunitaire à produire des cytokines de type Th1, Th2, anti- et pro-inflammatoires ont été étudiés chez la souris en utilisant la procédure de SDR (2ème chapitre).

L'aptitude du SDR à influencer le cours d'une infection de type Th1 a été évaluée chez la souris au moyen d'une infection par le BCG (3ème chapitre).

➢ Q3 : Quelles sont les caractéristiques de l'individu ou du facteur de stress capables d'influencer la nature et l'amplitude des altérations immunes observées après une défaite sociale ?

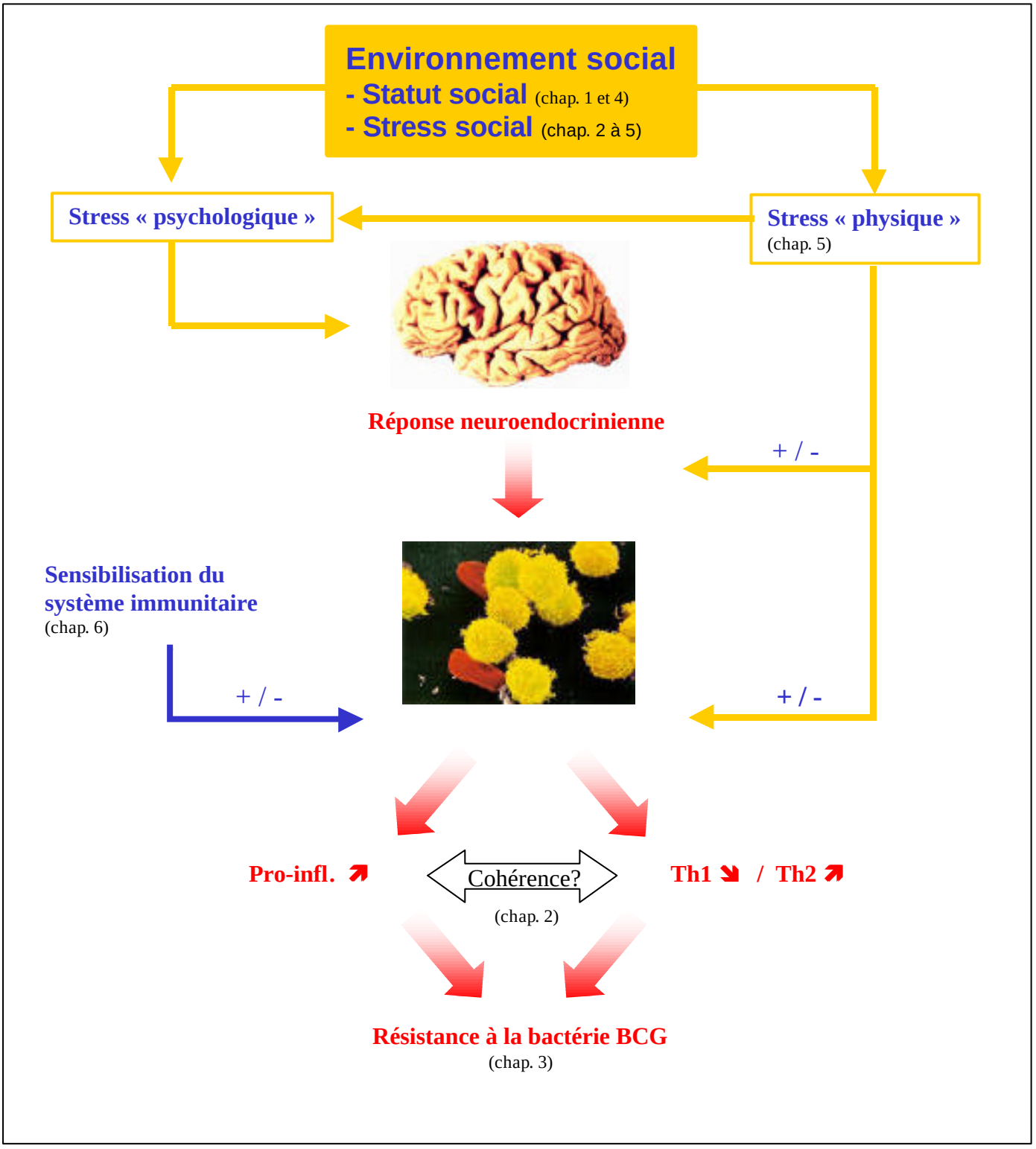


Figure 7: Objectifs de la thèse.

L’importance du rang social occupé par l’animal avant le stress a été testée en réponse au SDR chez la souris (4ème chapitre).

L’importance des combats a été étudiée chez la souris en comparant la réponse immunitaire dans deux situations de défaite sociale, l’une permettant les combats et les blessures, l’autre non (5ème chapitre).

L’hypothèse selon laquelle une stimulation immunitaire récente peut modifier la sensibilité du système immunitaire au stress a été testée en étudiant l’influence d’une injection préalable de LPS sur la réponse ultérieure à un stress de contention chez la souris (6ème chapitre).

1er chapitre : Conséquences comportementales, endocriniennes et immunitaires d'un challenge social chez le porc.

Objectifs : Le but de ce travail était d'évaluer les conséquences du stress associé à un changement de groupe social chez le porcelet sevré. Les effets du stress ont été appréciés au moyen de mesures comportementales, endocriniennes et immunitaires.

Matériel et méthodes : Des porcs ont été gardés avec leurs frères et sœurs de portée au moment du sevrage. Une paire de sœurs a été choisie par portée. Ces paires ont été réparties soit dans le groupe « stress social » et ont été changées de groupe à J0 (cinq jours après le sevrage), soit dans le groupe « témoin » et sont restées dans leur groupe d'origine. Dans le groupe « stress social », les combats ont été observés pendant les trente premières minutes afin de déterminer si le regroupement se soldait par une « victoire » ou une « défaite » des animaux expérimentaux sur leur groupe d'accueil. Le cortisol salivaire et l'activité comportementale ont été suivis de J–1 à J3. Des prélèvements sanguins ont été effectués trois heures après le regroupement ainsi qu'à J3 pour mesurer la prolifération lymphocytaire et la production d'IFN-γ par les cellules sanguines en réponse à la phytohémaglutinine.

Résultats : Le cortisol salivaire augmente après le regroupement et revient à des concentrations basales en 24 heures (Fig. 1 de l'article). Les concentrations de cortisol une et trois heures après le regroupement sont corrélées avec le statut social : les animaux obtenant un rang social élevé ont une élévation de cortisol moins importante (tableau 1 de l'article). Aucune des mesures immunitaires n'a été affectée par le regroupement (Fig. 2 de l'article).

En revanche, le stress induit des modifications comportementales. La fréquence de l'activité de repos est supérieure chez les animaux stressés (Fig. 3A de l'article). Le statut social est corrélé avec l'activité de repos, les animaux « vainqueurs » passant plus de temps couchés que les « perdants » (tableau 2 de l'article). La fréquence du comportement alimentaire n'est pas affectée par le stress. De J0 à J3, les animaux du groupe « stress social » présentent plus souvent que les témoins des activités comportementales décalées dans le temps par rapport à l'activité du reste du groupe (Fig. 3B de l'article). La fréquence des actes désynchronisés est la même quel que soit le statut social de l'animal.

Discussion et conclusion :

(1) Le regroupement pendant la période de post-sevrage est un événement stressant pour les porcs, induisant une réponse transitoire du cortisol salivaire et nécessitant des adaptations comportementales pendant plusieurs jours.

(2) Habituellement, chez des porcs plus âgés, le stress social inhibe la prolifération des leucocytes sanguins. Dans le cas présent, il est possible que les altérations immunitaires induites par le sevrage masquent d'éventuels effets du regroupement.

(3) L'augmentation des comportements désynchronisés peut être interprétée comme un moyen d'éviter des rencontres conflictuelles avec les résidents à l'auge ou à l'abreuvoir.

(4) La réponse comportementale et endocrinienne dépend du statut obtenu.

Þ L'amplitude de la réponse au stress de regroupement est modulée différemment selon que l'animal acquiert un statut de vainqueur ou de perdant à l'issue des combats.

BEHAVIOURAL, ENDOCRINE AND IMMUNE CONSEQUENCES OF SOCIAL STRESS IN WEANED PIGLETS

Elodie Merlot, Marie-Christine Meunier-Salaün, Armelle Prunier.

Unité Mixte de recherche sur le Veau et le Porc, INRA, 35590 Saint-Gilles, France.

En cours de soumission

Correspondence: Elodie Merlot, Tel.: +33.5.57.57.37.10. Fax: +33.5.56.98.90.29

E-mail: elodie.merlot@bordeaux.inserm.fr

ABSTRACT

Mixing piglets at weaning increases plasma cortisol concentrations and agonistic behaviour. In contrast to what is observed in older pigs, studies failed to show any effect of social environment on other behavioural variables or on immune function. The lack of effect of mixing may not reflect an absence of stress, but rather the fact that the physiological effects of social reorganisation are masked by the much more important effects of diet change. The aim of this experiment was to evaluate the reactivity of piglets to mixing by dissociating social reorganisation from weaning in itself. For this purpose, the influence of social stress was investigated five days after weaning (day 0) in eight control (C) and eight mixed (M) female pigs. Salivary cortisol and behavioural activity were measured from day –1 to day 3. Blood lymphocyte proliferation was measured on day 0 and 3. Cortisol levels were increased after mixing and returned to basal values within 24 hours. Blood lymphocyte proliferation was not affected. Mixing increased resting behaviour. Cortisol and behavioural responses were influenced by the social position of individuals in their new group. Piglets seemed to avoid conflicting encounters by diminishing the synchronisation of their activities with their new group. These results suggest that social reorganisation could be stressful for weaned pigs. However, piglets seem to develop behavioural strategies, which could explain the absence of long term endocrine and immune consequences of mixing.

Key words: mixing, piglet, cortisol, behaviour, immunity.

1. INTRODUCTION

Several practices occurring in modern pig husbandry can affect the animal's health and welfare. In growing or adult pigs, mixing of unfamiliar animals induces fighting (Rushen and Pajor, 1987; Moore et al., 1994; Otten et al., 1997), elevates heart rate (Otten et al., 1997; de Jong et al., 2001), plasma catecholamines (Otten et al., 1997; Ruis et al., 2001), body temperature (de Jong et al., 1999) and plasma cortisol (Moore et al., 1994; Deguchi and Akuzawa, 1998; Ruis et al., 2001) and reduces growth rate (Rundgren and Löfquist, 1989). Social reorganisation can also have immune consequences. It affects skin response to antigens (Moore et al., 1994), increases neutrophils / lymphocytes blood ratio (Moore et al., 1994; Ruis et al., 2001) and suppresses peripheral blood mononuclear cell proliferation (Hessing et al., 1995; Deguchi and Akuzawa, 1998; de Groot et al., 2001). Physiological consequences are usually transient, but there could be long-lasting behavioural alterations in defeated animals (Ruis et al., 2001).

In commercial piggeries, weaning often combines several stressful events such as a sudden change of diet, a move to a new housing environment, the mother-young link disruption and mixing with unfamiliar piglets. These sudden changes induce behavioural, endocrine and immune alterations (Blecha et al., 1985; Puppe et al., 1997; Carroll et al., 1998; Worobec et al., 1999) and are followed by a transient reduction of growth and digestive disorders (Madec et al., 1998; Carroll et al., 1998). Different stress factors involved in weaning including new housing environment (Metz and Gonyou, 1990; Puppe et al., 1997; Patience et al., 2000) and social reorganisation (Friend et al., 1983; Blecha et al., 1985; Puppe et al., 1997) have been studied. Studies showed that mixing piglets at weaning increases plasma cortisol concentrations and agonistic behaviour (Friend et al., 1983; Blecha et al., 1985; Puppe et al., 1997), but they failed to show any effect of social environment on other behavioural variables or on immune function (Blecha et al., 1985; Puppe et al., 1997). At weaning, the physiological effects of social reorganisation could be masked by the much more important effects of the diet change. In other words, the lack of effect of mixing would not mean that it is not perceived as a stressful event. The aim of this experiment was to evaluate the reactivity of piglets to mixing by dissociating social reorganisation from weaning in itself. For this purpose, we investigated the influence of mixing five days after weaning, when most of the acute physiological adjustments of weaning have disappeared (Metz and Gonyou, 1990;

Puppe et al., 1997; Carroll et al., 1998). The response to mixing was assessed by measuring salivary cortisol, blood lymphocyte proliferation, interferon-γ production and behavioural activity.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Experimental housing and animals

Eight sows (Large White x Landrace) were chosen at farrowing and piglets were weaned at 28 days of age. Six healthy female pigs per litter were chosen at weaning according to weight (8.9 ± 0.6 kg). Littermates were moved to a post-weaning experimental room and housed together in the same pen. The room consisted of twelve 1,2 x 1,3 mpens, with 90 cm- high wooden partitions between the pens, preventing visual and physical contact with other pigs. Artificial light was provided between 08:00 and 18:00. Piglets had free access to water and food. A commercial pellet diet (containing 3.43 Mcal digestible energy/kg and 20% crude protein) was given throughout the experiment. Each pig could be recognised by a tattoo number in the ear and a number painted on the back. During three days, pigs were accustomed to handling by experimenters. Observations started four days (d –1) and social reorganisation occurred five days (d 0) after weaning.

2.2. General procedure

Two females per pen were chosen as experimental animals and other litter-mates acted as companion animals. Pairs of sisters from four of the eight litters were assigned to the mixing group (M, n=8) and the four other pairs to the control group (C, n=8). At 08:00 on day 0, each pair of the M group was removed from its pen and was introduced in the pen of four unfamiliar litter-mates. They remained in their new pen until the end of the experiment on day 3. This protocol was chosen to create the optimum environment for overt aggression, since the two pigs were introduced on the territory of four resident and socially stable animals. The ethical endpoint of the procedure (presence of severe injuries or exclusion of piglets from the feeder) was not reached during the experiment. Control animals were left undisturbed in their litter-mate pen. This overall design was carried out in two repetitions.

Pigs were weighed on day –1 and day 3. Blood samples of approximately 10 ml were collected in plastic heparinized vacuutainer tubes in a separate room at 11:00 on days 0 and 3. Venipuncture usually required less than two minutes per animal. Three millilitres of blood were kept at 4°C for cell culture. Saliva samples were taken for determination of cortisol concentrations at 11:00 on day –1 (21 hours before mixing), at 8:00, 9:00, 11:00 and 16:00 on day 0 (0, 1, 3 and 8 hours after the beginning of the challenge), and at 11:00 on days 1, 2 and 3 (27, 51 and 75 hours post challenge). Samples were collected by giving animals a cotton bud to chew. The buds were placed in special centrifuge tubes and kept on ice until centrifuged for 10 minutes at 2000 g to remove the saliva. Saliva was stored at – 20°C until assayed for cortisol.

2.3. Physiological measures

Cortisol assay. Cortisol was measured in 200 µl saliva using a gamma coat cortisol ^{125}I RIA kit (Diasorin, 92182 Antony, France). The detection limit of the assay was 0.4 ng/ml saliva and a intra-assay coefficient of variation was 5.5% at 3.5 ng cortisol/ml. All samples were assayed in a single assay.

Proliferation of blood lymphocytes. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by density gradient centrifugation. Briefly, 3.0 ml of blood diluted with an equal volume of culture PBS were carefully layered on 3.5 ml of Ficoll-paque at a density of 1.077 g/ml (Pharmacia Biotech). After centrifugation, PBMC were collected from the interface. After two washes, viable PBMC were counted using trypan blue dye exclusion, and adjusted to $5x10^6$ cells/ml in RPMI supplemented with 10% of heat-inactivated foetal bovine serum and with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (2.5 µg/ml). Cell suspensions (5.10^5 cells/well) were cultured in triplicates in 96-well flat-bottomed cell culture plate (Nunc) in a final volume of 150 µl in presence of mitogen. Phytohemaglutinin (PHA-P, Sigma), a T-cell specific mitogen, was used at 6.25, 12.5 and 25 µg/ml. Culture plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 68 hours, MTT labelling reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma) was added at a final concentration 0.5mg/ml, and cells were incubated for 4 hours. The dark blue crystals were dissolved by adding 150 µl of stop solution (10% Triton X-100, 0.05 M HCl in isopropanol). The optical density was read at a test wavelength of 562 nm and a reference wavelength of 630 nm.

Interferon-g assay. PBMC were cultured with PHA as described above. Supernatants were harvested after 72 hours of incubation and stored at –20°C until assayed for interferon-γ (IFN-γ) concentrations. IFN-γ levels were assayed by sandwich ELISA, using reagents purchased from Biosource International (Camarillo, CA). Briefly, 96 well polystyrene Easy wash plates (Corning Incorporated, NY) were coated overnight at 2-8°C with mouse anti-swine IFN-γ antibodies (2.5 µg/ml, clone A151D5B8). Coated plates were then blocked two hours at room temperature. Samples or reference IFN-γ recombinant were dispensed to appropriate wells in a volume of 50 µl. Standard curve was constructed by diluting the recombinant swine IFN-γ ranging from 30 to 2000 pg/ml. Biotinylated mouse anti-swine IFN-γ antibodies (0.1 µg/ml, clone A151D13C5) were used as detection antibody and were added to the wells for two hours at room temperature. Plates were then incubated one hour with streptavidin-HRP. Plates were incubated for 15 min with substrate TMB-one (Fermentas, MD) and the enzyme-substrate reaction was stopped by adding 2M sulfuric acid. The optical densities were read at 450 nm.

2.4. Behaviour

Activity. Locomotor activity (standing and sitting), resting (lying), and feeding (head in the feeder) behaviours were monitored by video tape and analysed by scan-sampling at 5-min intervals during the light period (from 08:00 to 18:00) from days day –1 to day 3. The number of times when pigs were engaged in each situation were summed on 10 hours per day to estimate the frequency of each behaviour. The periods when animals were manipulated for saliva or blood sampling were not analysed. Analysis started again 15 minutes after the last experimenter had gone.

Behavioural synchronisation. The degree of behavioural synchronisation of experimental animals with their group was evaluated as follows: for each scan, the experimental pig was considered as non-synchronised with its group if it was engaged in an activity (locomotion or eating) while all the non-experimental animals were resting, or inversely. It was considered as synchronised with the group if at least one of the non-experimental pigs shared the same activity as the experimental animal. The results were expressed in frequency of non-synchronised acts over the 10-hour period.

Agonistic interactions. In the M group, agonistic behaviour was directly recorded by two observers during the first 30 min after mixing. Preliminary tests showed that the two observers had comparable judgements. Aggressive interactions were defined as "head-knocks", "biting", "parallel/inverse pressing", and submissive behaviours were "escape" and "avoidance" as described by Jensen (1980). For each dyad of pen-mates, the number of given and received aggressive acts was added up. Piglet received the score 1 if it was the winner of the dyad, 0 if it was the loser, 0.5 if the piglets were ex aequo. A global score was attributed to each piglet by adding up the 5 scores it obtained relatively to the 5 other pen-mates. According to this global score, piglets were attributed a dominance index from 1 (lowest ranking animal) to 6 (highest ranking animal).

2.5. Statistical analysis

Physiological and behavioural data were compared by analysis of variance using the GLM procedure of Statistica. Split-plot models were used with animal nested within litter, litter nested within treatment, treatment, time and time x treatment as sources of variation. The effect of litter was tested using animal within litter as sources of variation, and the effect of treatment using litter within treatment. The interaction treatment x time was tested using the residual variance of the model. When the interaction was significant, data were analysed separately for each factor level. PBMC proliferation was analysed separately for each day using treatment, litter nested within treatment, PHA dose and treatment x PHA dose as sources of variation. Salivary cortisol was analysed after a square root transformation to equalise the variance. Behavioural data were analysed after an Arcsin square root transformation. The Bonferroni test was used for post-hoc analysis. The Spearman's coefficient of correlation was used for analysing the relationships between dominance score, the number of given / received aggressive acts and behavioural and biological data in the M group.

3. RESULTS

3.1. Physiological responses

Time-related variations of salivary cortisol are presented in Fig. 1. There was a significant treatment x time interaction ($P<0.01$). Analysis within each treatment group showed that the

effect of time tended to be significant in the C group (P<0.06) and was significant in the M group (P<0.001). M pigs had significantly increased salivary cortisol concentrations 1 hour (P<0.01) and 3 hours (P<0.05) after the beginning of the stress in comparison to C group. Cortisol concentrations returned to levels similar to control within 8 hours. However, on day 1, M pigs tended to show lower CS levels than C pigs (p=0.07).

Fig.2 shows PBMC proliferation in response to different concentrations of PHA on days 0 and 3. There was a significant dose effect on days 1 and 3 (p<0.001). Treatment did not affect proliferation on days 1 and 3 (P>0.1). IFN-γ production was not influenced by treatment and by day (3170 ± 495 pg/ml, P>0.1).

3.2 Behaviour

Behavioural activity was assessed in the two groups of animals from day –1 to day 3. Resting activity was influenced by treatment (P<0.01) and day (P<0.05, Fig.3A). Indeed the occurrence of lying decreased with time (72 ± 2 % on day 3 vs. 78 ± 1 % on day –1), and M pigs were more often lying than C pigs (77 ± 1 % in M group vs. 74 ± 1 % in C group). There was no day x treatment interaction (P>0.1). Feeding behaviour was influenced by day (P<0.01), but not by treatment and day x treatment interaction (P>0.1). The occurrence of feeding behaviour increased with time (0.06 ± 1 % on day –1 vs. 0.08 ± 1 % on day 3, P<0.05). Both experimental groups had similar body weight (P>0.1) on day –1 (10.6 ± 04 kg) and on day 3 (11.8 ± 0.3).

Frequency of non-synchronised activities was influenced by treatment (P<0.01) and day (P<0.001). There was a day x treatment interaction (p=0.06, Fig.3B). The occurrence of this behaviour was stable over time in C group (P>0.1) but changed with time in M group (P<0.001). M animals displayed significantly more non-synchronised activities than C animals on days 0 (P<0.5), 1 (P<0.01) and 2 (P<0.001), but returned to similar frequencies on day 3 (P>0.1).

In socially disrupted pens, intense fights were observed during the 30 first minutes. The recording of agonistic acts allowed to determine a dominance index for each animal of the M pens. The two litter-mates introduced together in a new pen acquired close dominance status. Among the four pairs of M piglets, two pairs acquired dominant positions (dominance indexes

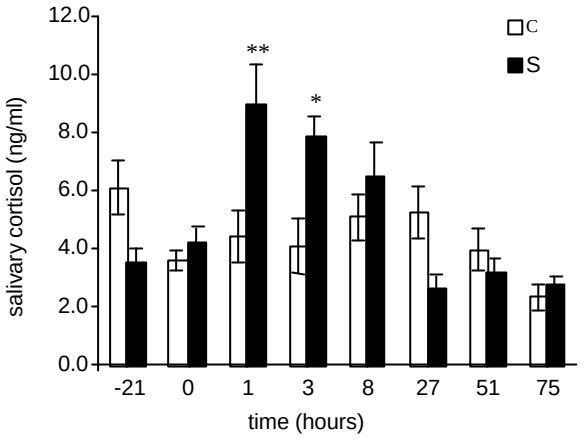


Fig.1: Salivary cortisol in control (C) and social stress (S) groups. S piglets were assigned to their new pen at time 0. Results are presented as mean ± sem.(* P<0.05, ** P<0.01)

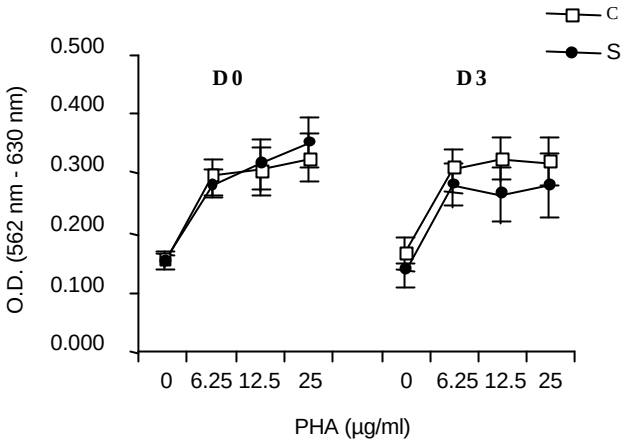


Fig. 2: *In vitro* PBMC proliferation in response to 0, 6.25, 12.5 and 25 µg/ml of PHA. Background optical density (O.D.) at 630 nm was substracted to the optical density at 562 nm. Results are presented as mean O.D. ± sem.

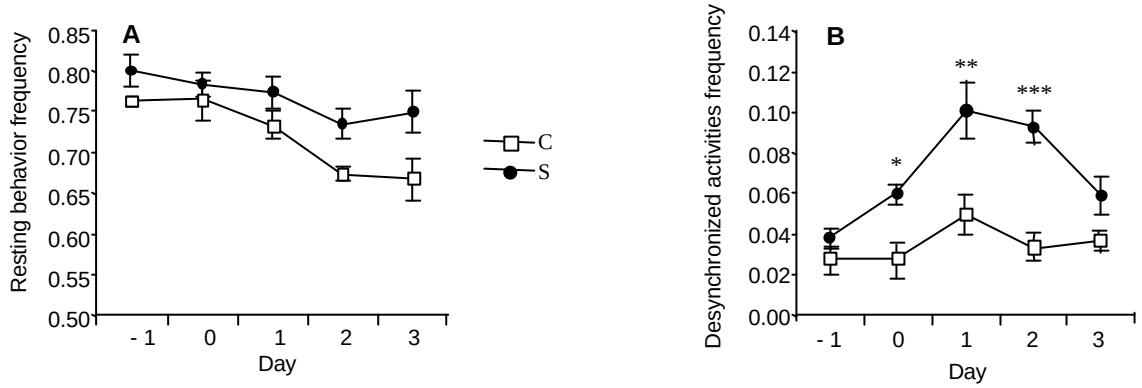


Fig. 3: Behavioural activity of piglets. Behaviour was analysed by scan-sampling from day -1 to day 3. A: Frequency of resting behavior ± sem. B: frequency of activities not synchronized with the rest of the group ± sem. (* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001)

Time (hours)	Correlation coefficient	n
- 24	0.03	7
0	-0.17	7
1	-0.78*	8
3	-0.96**	5
8	-0.28	8
24	0.85*	7
48	-0.27	8
72	-0.08	6

Table 1: Correlation between dominance index and salivary cortisol. Aggressive interactions were observed during the first 30 minutes after mixing, after what piglets were attributed a dominance index from 1 (lower ranking animal) to 6 (higher ranking animal). Salivary cortisol was measured 21 and 0 hours before and from 1 to 75 hours after mixing. (* P<0.05, ** P<0.01)

Time (day)	Correlation coefficient	n
- 1	-0.22	8
0	0.73*	8
1	-0.82*	8
2	-0.55	8
3	-0.31	8

Table 2: Correlation between dominance index and resting behaviour. Behavioural activity was monitored by scan-sampling from day –1 to day 3. For each day, the number of times where the pigs were lying was summed on a 10-hour observation period to estimate the frequency of resting behavior. (* P<0.05).

5 and 6) and two pairs acquired submissive positions (indexes 1 and 2 in one pen, indexes 1 and 3 in the other one).

Dominance index was negatively correlated with saliva cortisol 1 hours ($P<0.05$) and 3 hours ($P<0.01$) after the beginning of the challenge (Table 1). Dominant pigs had lower saliva cortisol levels than subordinate pigs. This correlation was inverted on day 1 ($P<0.05$). Dominance index was also positively correlated with resting on day 0 ($P<0.05$, Table 2). This correlation was again inverted on day 1 ($P<0.05$). Dominance index was not correlated with feeding behaviour, behavioural desynchronisation or PBMC proliferation ($P>0.1$). The number of given or received aggressive acts was not correlated with any of the physiological and behavioural data ($P>0.1$).

4. DISCUSSION

Relocation and social mixing were perceived as a stressful event, as shown by increased salivary cortisol levels. However, this elevation was modest and levels came back to control values within 24 hours. This result is in accordance with previous studies in which social conflict did not induce long-term changes in plasma cortisol levels in pigs (Blecha et al., 1985; Deguchi and Akuzawa, 1998; Ruis et al., 2001; de Groot et al., 2001). Mixing can have different consequences whether the animal becomes winner or loser (Fernandez et al., 1994; Otten et al., 1997; Tuchscherer et al., 1998; Ruis et al., 2001; de Groot et al., 2001). The amplitude of the stress response is linked to the degree of controllability of the animal over the situation (Mormède et al., 1988). As winners are supposed to have more control over the situation than losers (Tuchscherer et al., 1998), they should be less affected by social reorganisation than losers. Our results agree well with this hypothesis, as M pigs that obtained a high dominance position showed lower cortisol responses than low-ranking M piglets 1 and 3 hours after mixing. Surprisingly, M animals tended to show lower cortisol levels than C animals on day 1. This can be interpreted as a consequence of the negative feedback exerted by cortisol on the hypothalamo-pituitary axis. Similarly the negative correlation between cortisol levels and dominance index on day 1 could reflect a more important negative feedback in lower-ranking animals, which displayed higher cortisol responses on day 0. Indeed, cortisol data from sheep submitted to a stress of transport have shown that the

negative feedback exerted by cortisol is a major factor reducing the response to stress (Smith and Dobson, 2002).

Mixing (Hessing et al., 1995; Deguchi and Akuzawa, 1998; de Groot et al., 2001), shipping (Hicks et al., 1998) or intracerebroventricular corticotropin-releasing hormone injection (Johnson et al., 1994) can decrease the ability of PBMC to proliferated in response to mitogens. Social rank has been previously reported to influence the immune system response after social reorganisation (Tuchscherer et al., 1998; de Groot et al., 2001). In the present study, PBMC proliferation was not affected by social stress and we did not find any correlation between PBMC proliferation and social dominance. Our results and those from other studies (Blecha et al., 1985; Puppe et al., 1997) suggest that changes in social environment are not able to induce alterations in the functioning of the immune system of weaned piglets. However, two reasons can be proposed to explain why mixing did not affect PBMC in this study. First, social stress seems to have stronger effects on PBMC proliferation in barrows than in gilts (de Groot et al., 2001) and only females were used in the present experiment. Secondly, young weaned pigs could be less sensitive to social stress than older pigs. Indeed, depressed PBMC responses after mixing were always observed in older piglets (6 to 15-week-old), at least two weeks after weaning (Hessing et al., 1995; Deguchi and Akuzawa, 1998; de Groot et al., 2001). A lower sensitivity of weaned piglets to mixing could be due to a lesser importance of social disruption at this age of the development.

Stress can decrease locomotor activity (Hay et al., 2003), increase the frequency of sitting position (Jensen et al., 1996) and behavioural transitions (Jensen et al., 1996) and decrease feeding behaviour (de Jong et al., 1999) in pigs. In the present experiment, the occurrence of eating or lying was similar to what was previously observed in piglets weaned at 28 days of age (Metz and Gonyou, 1990). Feeding behaviour and growth were not affected by mixing. This observation is in agreement with previous reports on social reorganisation in weaned pigs (Friend et al., 1983). Our observations, in accordance with others (Hay et al., 2003), show that social stress increased the occurrence of lying behaviour. Correlation analysis showed that dominance index was correlated with behavioural activity in M piglets. This result is consistent with cortisol data and shows that winner and loser pigs did not react in the same way to mixing.

Behavioural synchronisation of experimental piglets with their group was assessed to estimate the normalisation of social relationships and the integration of pigs in their new group. Groups of pigs usually show synchronised activities. In the present experiment, M animals were more often lying when all the residents were in an active phase, and on the contrary they were more often eating or standing while the resident piglets were lying than control animals did. This behaviour could be interpreted as an attempt to avoid conflicting situations by limiting the number of encounters of M piglets with residents at the feeder or at the water nipple. Therefore, the increased behavioural desynchronisation suggests that M piglets developed behavioural adaptation to the situation. The duration of this behaviour from day 0 to day 2 indicates that social integration took at least three days.

In conclusion, the results of this study show that mixing in weaned piglets induced a transient cortisol response, increased resting behaviour and did not affect peripheral blood mononuclear cell proliferation. The cortisol and behavioural responses were influenced by the social position of individuals in their new group, showing that winner and loser pigs did not react in the same way to mixing. Piglets seemed to avoid conflicting encounters by desynchronising their activities with the group. These results show that mixing young piglets is stressful but that animals develop behavioural strategies to adapt to the situation.

Acknowledgements

The authors thank Nathalie Le Floc'h, Isabelle Oswald, Philippe Pinton and Anne-Marie Mounier for their technical help and useful discussions, and Dr. Pierre Neveu for his critical review of the manuscript.

REFERENCES

Blecha, F., Pollmann, D. S. and Nichols, D. A., 1985. Immunologic reactions of pigs regrouped at or near weaning. Am. J. Vet. Res. 46, 1934-1937.

Carroll, J. A., Veum, T. L. and Matteri, R. L., 1998. Endocrine responses to weaning and changes in post-weaning diet in the young pig. Domest. Anim. Endocrinol. 15, 183-194.

de Groot, J., Ruis, M. A. W., Scholten, J. W., Koolhaas, J. M. and Boersma, W. J. A., 2001. Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. Physiol. Behav. 73, 145-158.

de Jong, I. C., Lambooij, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M., 1999. Mixing induces long-term hyperthermia in growing pigs. Anim. Sci. 69, 601-605.

de Jong, I. C., Sgoifo, A., Lambooij, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M., 2001. Effects of social stress on heart and heart rate variability in growing pigs. Can. J. Anim. Sci. 80, 273-280.

Deak, T., Meriwether, J. L., Fleshner, M., Spencer, R. L., Abouhamze, A., Moldawer, L. L., Grahn, R. E., Watkins, L. R. and Maier, S. F., 1997. Evidence that brief stress may induce the acute phase response in rats. Am. J. Physiol. 273, R1998-R2004.

Deguchi, E. and Akuzawa, M., 1998. Effects of Fighting after Grouping on Plasma Cortisol Concentration and Lymphocyte Blastogenesis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Mitogens in Piglets. J. Vet. Med. Sci. 60, 149-153.

Elson, E. C., 1974. Quantitative determination of serum haptoglobin. A simple and rapid method. Am. J. Clin. Pathol. 62, 655-663.

Fernandez, X., Meunier-Salaün, M.-C. and Mormède, P., 1994. Agonistic behavior, plasma stress hormones, and metabolites in response to dyadic encounters in domestic pigs: interrelationships and effect of dominance status. Physiol. Behav. 56, 841-847.

Friend, T. H., Knabe, D. A. and Tanksley, T. D., 1983. Behavior and performance of pigs grouped by three different methods at weaning. J. Anim. Sci. 57, 1406-1411.

Hay, M., Vulin, A., Génin, S., Sales, P. and Prunier, A., 2003. Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. Appl. Anim. Behav. Sci. 82, 201-218.

Hessing, M. J. C., Coenen, G. J., Vaiman, M. and Renard, C., 1995. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 45, 97-113.

Hicks, T. A., McGlone, J. J., Whinsnant, C. S., Kattesh, H. G. and Norman, R. L., 1998. Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress. J. Anim. Sci. 76, 474-483.

Jensen, K. H., Pedersen, L. J., Nielsen, E. K., Heller, K. E., Ladewig, J. and Jørgensen, E., 1996. Intermittent stress in pigs: effects on behavior, pituitary-adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration. Physiol. Behav. 59, 741-748.

Jensen, P., 1980. An ethogram of social interaction patterns in group-housed dry sow. Appl. Anim. Ethol. 6, 341-350.

Johnson, R. W., Von Borell, E. H., Anderson, L. L., Kojic, L. D. and Cunnick, J. E., 1994. Intracerebroventricular injection of corticotropin-releasing hormone in the pig: acute effects on behavior, adrenocorticotropin secretion, and immune suppression. Endocrinology 135(2), 642-648.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S. and Jestin, A., 1998. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. Prevent. Vet. Med. 35, 53-72.

Metz, J. H. M. and Gonyou, H. W., 1990. Effect of age and housing conditions on the behavioral and haemolytic reaction of piglets to weaning. Appl. Anim. Behav. Sci. 27, 299-309.

Moore, A. S., Gonyou, H. W., Stookey, J. M. and McLaren, D. G., 1994. Effect of group composition and pen size on behavior, productivity and immune response of growing pigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 40, 13-30.

Mormède, P., Dantzer, R., Michaud, B., Kelley, K. W. and Le Moal, M., 1988. Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats. Physiol. Behav. 43, 577-583.

Otten, W., Puppe, B., Stabenow, B., Kanitz, E., Schön, P. C., Brüssow, K. P. and Nürnberg, G., 1997. Agonistic interactions and physiological reactions of top- and bottom-ranking pigs confronted with a familiar and unfamiliar group: preliminary results. Appl. Anim. Behav. Sci. 55, 79-90.

Patience, J. F., Gonyou, H. W., Whittington, D. L., Beltranena, E., Rhodes, C. S. and Van Kessel, A. G., 2000. Evaluation of site and age of weaning on pig growth performance. J. Anim. Sci. 78, 1726-1731.

Puppe, B., Tuchscherer, M. and Tuchscherer, A., 1997. The effect of housing conditions and social environment immediately after weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/lymphocyte ratio, and plasma glucose level in pigs. Livest. Prod. Sci. 48, 157-164.

Ruis, M. A. W., de Groot, J., Te Brake, J. H. A., Ekkel, E. D., van de Burgwal, J. A., Erkens, J. H. F., Engel, B., Buist, W. G., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M., 2001. Behavioral and physiological consequences of acute social defeat in growing gilts: effects of the social environment. Appl. Anim. Behav. Sci. 70, 201-225.

Rundgren, M. and Löfquist, I., 1989. Effects on performance and behaviour of mixing 20-kg pigs fed individually. Anim. Prod. 49, 311-315.

Rushen, J. and Pajor, E., 1987. Offence and defence in fights between young pigs (*sus scrofa*). Aggressive Behav. 13, 329-346.

Smith, R. S. and Dobson, H., 2002. Hormonal interactions within the hypothalamus and pituitary with respect to stress and reproduction in sheep. Domest. Anim. Endocrinol. 23, 75-85.

Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A. and Kanitz, E., 1998. Effect of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs. Physiol. Behav. 64, 353-360.

Worobec, E. K., Duncan, I. J. H. and Widowski, T. M., 1999. The effects of weaning at 7, 14 and 28 days on piglet behaviour. Appl. Anim. Behav. Sci. 62, 173-182.

2ème chapitre : Effets de la défaite sociale sur la production de cytokines chez la souris.

Objectifs : Etant donné la variabilité de la réponse à un stress social selon qu'il débouche sur une victoire ou sur une défaite, la suite des travaux a été réalisée à partir d'un protocole de stress induisant systématiquement une défaite sociale. D'après les données de la littérature, chez la souris, le stress de défaite sociale chronique (SDR) induit de profondes altérations de la réactivité des cellules de la rate à un stimulus inflammatoire, favorisant la libération d'IL-6, d'IL-1 et de TNF-α par ces dernières. Cet état inflammatoire est aggravé par le fait que les splénocytes des souris stressées présentent une sensibilité diminuée à l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes. L'objectif de ce travail était de déterminer si le profil pro-inflammatoire induit dans la rate par le SDR est associé à une orientation de type Th2. En parallèle, cette étude avait pour but de vérifier que le SDR induit bien un état pro-inflammatoire et une sensibilité réduite aux glucocorticoïdes dans nos conditions expérimentales.

Matériel et méthodes : Des souris balb/c logées en groupe de cinq ont subi six sessions de SDR. Afin d'étudier l'effet du stress sur la réponse humorale, les animaux ont été vaccinés contre un antigène, la KLH, immédiatement avant la première session de SDR. Des prélèvements orbitaux de sang ont été effectués sept jours avant le début du stress, juste après la première et juste après la dernière session de SDR afin de mesurer les concentrations de corticostérone et d'IL-6 circulantes. Les animaux ont été sacrifiés le lendemain du dernier jour de stress.

La capacité des splénocytes à proliférer a été mesurée *in vitro* en réponse au LPS, un activateur des lymphocytes B et des monocytes/macrophages, et à la concanavaline A, un mitogène des lymphocytes T. Les productions d'IFN-γ, d'IL-10 et d'IL-6 ont été mesurées en réponse à ces mêmes mitogènes. La sensibilité des splénocytes à la corticostérone a été mesurée en cultivant les cellules en présence de LPS et de doses croissantes de corticostérone. Comme les glucocorticoïdes inhibent la production d'IL-6, une sensibilité décrue à la corticostérone chez les animaux stressés se traduit par une moins forte inhibition de la libération d'IL-6 dans le surnageant de culture que chez les animaux témoins.

Résultats : La défaite sociale induit une augmentation des concentrations plasmatiques de corticostérone et d'IL-6 par rapport au groupe témoin (Fig. 1 de l'article). Les taux d'immunoglobulines G anti-KLH sont les mêmes dans les deux groupes.

Les animaux du groupe SDR présentent des rates plus grosses, contenant plus de cellules mononucléées, avec une prolifération spontanée accrue. En réponse au LPS, la prolifération est légèrement augmentée par le stress (Fig. 2 de l'article). Le SDR favorise la production d'IL-6, diminue celle d'IFN-γ et n'affecte pas celle d'IL-10 (Fig. 3A de l'article). Dans les cultures stimulées à la concanavaline A, le stress diminue très légèrement la prolifération (Fig 2 de l'article), augmente la production d'IL-6 et d'IFN-γ et diminue celle d'IL-10 (Fig. 3B de l'article).

Le SDR diminue la sensibilité des splénocytes à la corticostérone. Cet effet est visible sur la production d'IL-6, mais aussi sur celle de la cytokine Th1 IFN-γ (Fig. 4 de l'article).

Discussion et conclusion :

(1) Le stress social, comme d'autres stress tels que la contention ou les chocs électriques, est en mesure d'induire une augmentation d'IL-6 plasmatique.

(2) La production accrue d'IL-6 en réponse au LPS et la diminution de sensibilité des splénocytes à la corticostérone confirment que le SDR a un effet pro-inflammatoire sur les splénocytes.

(3) En comparaison du profil de production chez les animaux témoins, les niveaux d'IL-10 et d'IFN-γ produits par les lymphocytes stimulés à la concanavaline A suggèrent que le stress favorise un profil de type Th1. Cette idée est renforcée par le fait que la résistance à la corticostérone se traduit aussi par une moindre inhibition de la production d'IFN-γ par l'hormone. Cependant, le SDR favorise aussi la production d'IL-6 par les lymphocytes T, une cytokine de type Th2. Ces résultats ne permettent pas de conclure avec certitude à une orientation vers un profil Th1, mais permettent d'affirmer que le stress n'a pas fait pencher la balance vers un profil Th2.

Þ In vitro, la défaite sociale induit une réactivité accrue à un stimulus inflammatoire et diminue la sensibilité des cellules de la rate aux glucocorticoïdes. Cet état inflammatoire n'est pas associé à une orientation Th2.

CYTOKINE PROFILE DURING SOCIAL DEFEAT IN MICE

Elodie Merlot, Elisabeth Moze, Robert Dantzer and Pierre J Neveu.

Neurobiologie Intégrative, INRA-INSERM, Institut François Magendie, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France.

En cours de soumission

Correspondence: Elodie Merlot, Tel.: +33.5.57.57.37.10. Fax: +33.5.56.98.90.29

E-mail: elodie.merlot@bordeaux.inserm.fr

ABSTRACT

The aim of the present study was to investigate the pro-inflammatory effect of social defeat in mice and to determine whether it is associated with a Th1 shift in cytokine production. For this purpose, splenocytes from control mice (C) and mice socially stressed for 7 days (SDR) were cultured with LPS or Con A. Proliferation, cytokine production and sensitivity of spleen cells to corticosterone were assessed in vitro. The humoral response to a KLH immunization was assessed.

SDR induced splenomegaly and enhanced splenocyte spontaneous proliferation. SDR increased the production of IL-6 in both LPS and Con A stimulated cultures. The pro-inflammatory influence of SDR was confirmed by unchanged levels of IL-10 in LPS-stimulated cultures, and by a reduced sensitivity of spleen cells to the anti-inflammatory effect of corticosterone in comparison to controls. However the inflammatory cytokine IFN-γ was decreased by stress in LPS-stimulated cultures. The increase in IFN-γ and the decrease in IL-10 levels in Con A-stimulated cultures from stressed animals accords with a shift toward a Th1 profile. Furthermore, the reduced sensitivity to glucocorticoids resulted in a smaller inhibition by corticosterone of the release of IFN-γ in SDR mice. Plasma anti-KLH antibody levels were similar in both groups. These results demonstrate that repeated social defeat has a pro-inflammatory effect, and is not associated with a Th2 shift.

Key words: social defeat, interleukin-6, interleukin-10, Interferon-γ, mice.

1. INTRODUCTION

Among the wide range of stressors commonly used in laboratory animals, social stress is one that can be the more easily related to a natural everyday life challenge. Social stress can induce many changes in immune variables such as altered leukocyte subset populations (Stefanski and Engler, 1999; Stefanski *et al.*, 2003), decreased cytokine production (Bartolomucci *et al.*, 2001; de Groot *et al.*, 2002) and decreased antibody production (Bohus *et al.*, 1993; de Groot *et al.*, 2002). Socially stressed rodents show increased susceptibility to parasitic or viral infections (Barnard *et al.*, 1993; Padgett *et al.*, 1998; Sheridan *et al.*, 2000).

Stress has been proposed to have a differential effect on type 1 (Th1) and type 2 (Th2) T helpers and on the production of Th1/Th2 cytokines by T and other immune cells (Elenkov and Chrousos, 1999). The main Th1 cytokines are IL-2 and IFN-γ. Th2 cytokines are IL-4, IL-6 or IL-10. Glucocorticoids released during stress would act at on both macrophages and T-cells to induce Th2 and suppress Th1 cytokine production (Ramírez *et al.*, 1996; DeKruyff *et al.*, 1998). By inducing a shift toward a Th2 profile, stress could boost humoral immunity and suppress cell-mediated immunity. Indeed, stressors such as restraint or foot shocks appear to induce a Th2 profile (Fleshner *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1998; Iwakabe *et al.*, 1998). In contrast, increasing literature suggests that stress can have a pro-inflammatory effect (Black, 2002). For example, a model of chronic social defeat was shown to be associated with a systemic pro-inflammatory state in mice, characterized by high levels of IL-6 in splenocyte cultures, increased production of IL-1, IL-6 and TNF-α after an *in vivo* LPS challenge, and reduced sensitivity of spleen macrophages to the anti-inflammatory effect of corticosterone (Stark *et al.*, 2001; Quan *et al.*, 2001). As Th1 cytokines are pro-inflammatory and Th2 cytokines are mainly anti-inflammatory, we made the hypothesis that the pro-inflammatory state induced by stress would favor not a Th2 but a Th1 shift.

The aim of the present study was to investigate the pro-inflammatory effect of repeated social defeat in mice and to determine whether it is associated with a Th1 shift in cytokine production. The first objective was to investigate the pro-inflammatory effect of defeat on cytokine production by assessing the *in vitro* production of inflammatory cytokines (IFN-γ, IL-6) in response to LPS, and by measuring the sensitivity of spleen cells to corticosterone. The second objective was to determine whether social defeat was associated with a Th1 profile. For this purpose, the *in vitro* production of Th1 (IFN-γ,IL-12) and Th2 (IL-6, IL-10)

cytokines by T cells was measured. The production of IFN-γ by spleen cells under increasing doses of corticosterone was measured to assess whether glucocorticoids are less potent in inhibiting the production of Th1 cytokines in stressed mice. As a Th2 profile favors humoral immunity, plasma antibody in response to KLH immunization was assessed in order to determine whether defeat decreased humoral immunity.

2. METHODS

Animals

Experimental animals were three-month old male BALB/c ByJ@Ico mice received at five weeks of age from Charles River laboratories (St Germain sur l'Arbresle, France). They were randomly assigned to groups of five mice, housed in a temperature-controlled room (24 ± 1°C) with a 12 h light cycle (lights on 14:00-2:00 h) and had free access to food and water. The mice used as aggressive intruders were six-month old individually housed CD1 mice.

The immune effects of SDR were tested in two independent experiments. In the first experiment, mice were randomly assigned to two different treatment groups labeled control (C, n=34) and social disruption stress (SDR, n=28). Animals were injected intra peritoneally with 100 µg keyhole-limpet hemocyanin (KLH, Sigma) in 0.5 ml saline just before the first stress session. Mice underwent SDR or C treatments from day 1 to day 7. Samples of approximately 80 µl of blood were collected from the retroorbital plexus for corticosterone and IL-6 assays. Samplings occurred between 16:00 and 17:00 one week before the stress period (day -7), immediately after the first stress session (day 1) and immediately after the last session (day 7). Plasmas were frozen at –20°C until analysis. Animals were sacrificed on day 8 between 9:00 and 10:30, seventeen hours after the last stress session. Trunk blood was collected for IL-6 and anti-KLH immunoglobuline assay. Spleens were removed for studying in vitro proliferation of splenocytes and production of cytokines in response to lipopolysaccharide (LPS) or concanavaline A (Con A). In a parallel experiment, in vitro sensitivity of splenocytes from SDR (n=12) and C (n=12) mice to corticosterone was studied in mice submitted to the same stress protocol.

SDR animals underwent six SDR sessions (three days of stress, one day of rest, three additional days of stress) as previously described (Stark et al., 2001). In each SDR session, a

new older isolated aggressive male was introduced into the home cage of the subjects for two hours between 14:00 and 16:00. Behavior was observed directly, and the intruder was replaced if he did not attack or if he was attacked by one of the residents. All residents showed submissive postures. Control mice remained undisturbed in their home cage. The protocol was approved by the regional Animal Care Committee, in accordance with the French legislation on welfare of laboratory animals.

Plasma corticosterone

Plasma corticosterone concentrations were measured following ethanol extraction by a radiocompetitive binding assay using rhesus monkey transcortin, [^{3}H]corticosterone as the tracer, and dextran-coated charcoal as the adsorbent of free radioactivity (Liège *et al.*, 2000). Inter- and intra-assay coefficients of variation were 14 and 7% respectively. All samples were assayed in a single assay.

Mitogen-induced proliferation of spleen cells

Spleens were removed aseptically, weighted and dissociated in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Glasgow, UK). Addition of 2 ml lysis buffer (0.28 M NH_4Cl, 0.02 M $KHCO_3$, 0.01 M EDTA) for 1 minute eliminated red blood cells. After three washes, viable mononuclear cells were counted using trypan blue dye exclusion, and adjusted to 2.10^7 cells/ml in medium containing 5% heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic antimycotic solution (Gibco). Cells were distributed in triplicates (2.10^5 cell/well) in flat-bottom 96-wells plates without any mitogen or in the presence of 13 µg/ml lipopolysaccharide from *E. Coli* (LPS, O127:B8 serotype, Sigma) or 1µg/ml Concanavalin A (Con A, Sigma) in a final volume of 150 µl. After 72 hours, 0.5 µCi/well of [H^3]thymidine (specific activity 5Ci/mmol, CEA, France) was added in a volume of 50 µl for 24 hours. Cells were collected on fiberglass strips using a multiple harvester, and radioactivity determined in a liquid scintillation counter. Results were expressed in counts per minute (cpm).

In vitro cytokine production and corticosterone sensitivity assay

Spleen cell suspensions (4.10^6cell/well) were distributed in 24-wells culture plates in a final volume of 1 ml in presence of 13 µg/ml LPS or 1 µg/ml Con A. The sensitivity of splenocytes to corticosterone was tested by cultivating cells in presence of 13 µg/ml LPS and increasing doses of corticosterone (Sigma). Corticosterone was diluted in ethanol at 0.01% final. Culture

plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 hours of incubation, cell supernatants were harvested and frozen at –20°C until cytokine analysis.

Cytokine determinations

Interleukin-10 (IL-10), interleukin-6 (IL-6) and interferon gamma (IFN-γ) were measured after adequate dilutions using sandwich ELISAs (BD Pharmingen). Interleukin-12 was measured using mouse IL-12 p70 ELISA kit (R&D Systems). Intra and inter assay variability were 4% and 5% at 500 pg/ml for IL-10, 5% and 9% at 150 pg/ml for IL-6, 8% and 8% at 550 pg/ml for IFN-γ, and 9% and 4% at 29 pg/ml for Il-12. Assay ranges were 15.6 – 1000 pg/ml for IFN-γ and IL-6, 31.3 – 2000 pg/ml for IL-10 and 7.8 – 500 pg/ml for IL-12.

Plasma anti-KLH antibodies

Anti-KLH gamma immunoglobulins (IgG) were measured by direct ELISA (Sacerdote *et al.*, 2000). Mice sera were diluted 1:10, 1:25 and 1:50 in phosphate buffered saline/Tween. Alkaline-phosphate-conjugated goat anti-mouse IgG (chain specific, Sigma), diluted 1:12000 in PBS/Tween was used as detection antibody. Colorimetric reaction was obtained after adding p-nitrophenyl-phosphate substrate (ready to use, Sigma).

Statistical analysis

Plasma IL-6, plasma corticosterone and IL-6 production under increasing doses of CS were analyzed for the effect of the main factor (C or SDR) by analysis of variance, using a repeated measures design. The Tukey's test was used for post-hoc analysis. For the other data, a Student test was used to compare C and SDR groups. Adequate transformation (log10 or square root) were used to homogenize the variances when necessary. Splenocyte proliferation data did not follow a normal distribution and were analyzed by a Mann-Whitney test.

3. RESULTS

Plasma corticosterone (CS) levels were measured in basal conditions, after the first SDR session, after the last SDR session and at time of sacrifice (days –7, 1, 7 and 8, Fig. 1A). There was a significant effect of the day of sampling ($F(3,123)=29.9$, $p<0.001$), the treatment group ($F(1,123)=11.6$, $p<0.01$) and the interaction ($F(3,123)=9.9$, $p<0.001$). CS were higher on day 1 than on the three other days in both C and SDR groups ($p<0.01$). Compared to

controls, mice that experienced SDR showed significantly higher levels of CS immediately after the first and after the final cycle of stress ($p<0.001$). The effect of SDR did not last until day 8 since the two groups were comparable at this time ($p>0.1$).

Plasma IL-6 was measured on days –7, 7 and 8 (Fig.1B). There was a significant effect of the day of sampling ($F(2,90)=27.9$, $p<0.001$), the treatment group ($F(1,90)=57.0$, $p<0.001$) and the interaction ($F(2,90)=20.7$, $p<0.001$). Levels were similar in SDR and C groups on day –7. Plasma IL-6 was increased in SDR group immediately after the last SDR session ($p<0.001$), and returned to levels comparable to those of control animal within day 8 ($p>0.1$).

Plasma concentrations of anti-KLH IgG were not affected by SDR ($p<0.1$). Optical densities for the dilution 1/25 were 0.66 ± 0.03 in C and 0.60 ± 0.04 in SDR group.

SDR mice exhibited splenomegaly. Spleen weight was 0.38 ± 0.01 g in C group and 0.58 ± 0.01 g in SDR group ($p<0.001$). Accordingly, the cell counts were higher in SDR mice ($129 \pm 4 .10^6$ cells per spleen) than in C mice ($105 \pm 3 .10^6$ cells per spleen, $p<0.001$). Despite adjustment for the cell number, SDR increased the spontaneous proliferation of spleen cells ($p<0.05$) and the proliferation in LPS stimulated cultures ($p<0.01$, Fig.2). In contrast, response to concanavalin A was slightly but significantly decreased in SDR mice compared to C mice ($p<0.001$).

In vitro production of cytokines was assessed in splenocytes stimulated by LPS or Con A. In LPS stimulated cultures (Fig.3A), IL-6 levels were increased by 68 % ($p<0.01$) and IFN-γ levels were decreased by 36% ($p<0.05$) in the SDR group as compared to the C group. IL-10 production was not modified. In Con A stimulated cultures (Fig.3B), IL-6 levels were also increased by 62% ($p<0.001$). However, effects of SDR on IFN-γ and IL-10 levels were different compared to LPS-treated cultures. IFN-γ production increased by 59% ($p<0.001$) and IL-10 production decreased by 18% ($p<0.05$) in SDR mice in comparison to controls. IL-12 concentrations did not reach detectable levels.

Sensitivity of splenic cells to corticosterone is shown in Fig.4. There was a significant effect of the dose of corticosterone ($F(3,60)=274.4$, $p<0.001$), the treatment group ($F(1,60)=37.5$, $p<0.001$) and the interaction ($F(3,60)=5.4$, $p<0.001$). Addition of corticosterone decreased IL-6 production in a dose-dependent fashion. Splenocytes from SDR mice produced more IL-6 in comparison to controls in the presence of 0 ($p<0.05$), 0.05 µM ($p<0.001$), 0.1 µM ($p<0.001$)

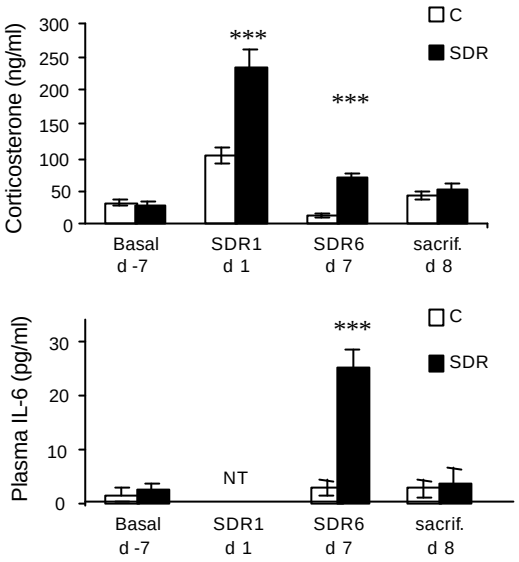


Fig.1: Plasma corticosterone (A) and IL-6 (B) in C and SDR mice one week before the first stress session (day -7), just after the first and the last SDR sessions (days 1 and 7) and at time of sacrifice (A). Data are presented as mean ± sem. NT: not tested. *** $p < 0.001$.

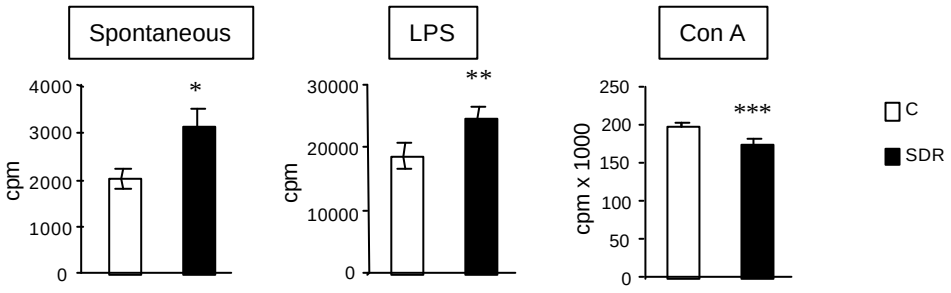


Fig.2: Splenocyte proliferation in C and SDR mice. Animals were sacrificed on day 8, spleens were removed and splenocytes were cultured for 4 days without any mitogen (spontaneous proliferation) and in response to LPS or Con A stimulation. Results are expressed as counts per minute (cpm). Data are presented as mean ± sem. * $p < 0.05$, **$p<0.01$, ***$p<0.001$.

and 1 µM ($p<0.05$) of corticosterone. Similarly, corticosterone decreased IFN-γ in a dose dependant fashion ($F(3,57)=575.5$, $p<0.001$) and the effect of group treatment was significant ($F(1,57)=4.6$, $p<0.05$). SDR mice produced more IFN-γ in the presence of 0.05 µM ($p<0.01$), 0.1 µM ($p<0.01$) and 1 µM ($p<0.05$). These results show that SDR reduced the sensitivity of splenic cells to corticosterone.

4. DISCUSSION

In the present study, we demonstrated that social defeat in Balb/c mice induced profound alterations in spleen cells. SDR induced splenomegaly and increased splenocyte spontaneous proliferation. SDR had a pro-inflammatory effect, as shown by the release of plasma IL-6, the increased production of IL-6 in response to both LPS and Con A, and the reduced splenocyte sensitivity to corticosterone. In response to the T-cell mitogen Con A, IFN-γ levels were increased and those of IL-10 were slightly decreased. Social defeat did not affect the humoral response to KLH.

Plasma corticosterone and IL-6 levels were measured to confirm that SDR induced a stress response. SDR increased plasma corticosterone levels in comparison to control group. The increased plasma levels in both treatment groups on day 1 can be explained by the KLH injection, which was performed just before the SDR cycle. In accordance with our previous findings, SDR enhanced plasma IL-6 and the cytokine levels were back to control values on the day following the last stress session (Merlot et al., 2003). As SDR provokes fights among animals, skin wounds could be the source of plasma IL-6. However, as the number of skin injuries increased with the repetitions of SDR sessions, the levels of IL-6 should have been higher on the final stress session. Furthermore, in the case of a local inflammation, blood levels of IL-6 should remain elevated for one night after the end of the last SDR session. This indicates that IL-6 found in plasma after SDR is not related to wounds but has probably the same origin as IL-6 found after other stressors such as footshock, open-field test or restraint (LeMay et al., 1990; Zhou et al., 1993; Merlot et al., 2002). The mechanisms of the induction of plasma IL-6 after stress still remain to be clarified. IL-6 is not produced in the spleen (Zhou et al., 1993; Nukina et al., 2001) but is more likely to be derived from the liver or adrenals (Zhou et al., 1993; Takaki et al., 1996; Kitamura et al., 1997; Nukina et al., 2001; Nukina et al., 2001; Nukina et al., 2001) as a result of sympathetic activation (Takaki et al., 1994; Takaki et al., 1996; Takaki et al., 1996). Similar transient increases in plasma IL-6 of

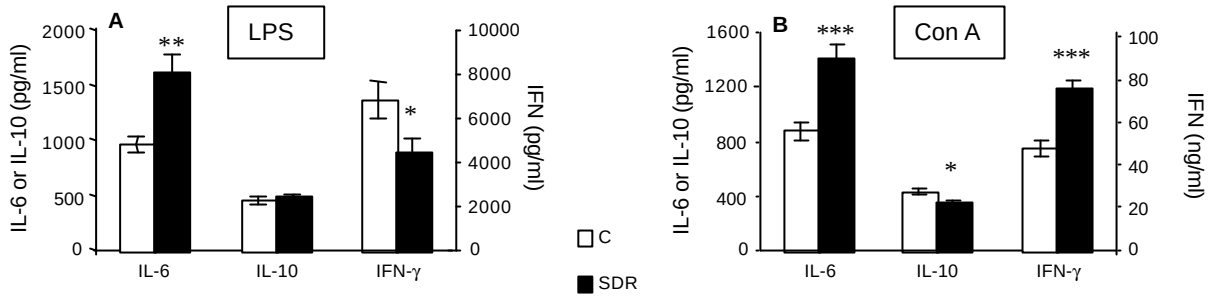


Fig.3: Cytokine production in C and SDR mice. Splenocytes were stimulated by LPS (A) or Con A (B). Data are presented as mean ± sem. *p<0.05, **p<0.01,*** p < 0.001.

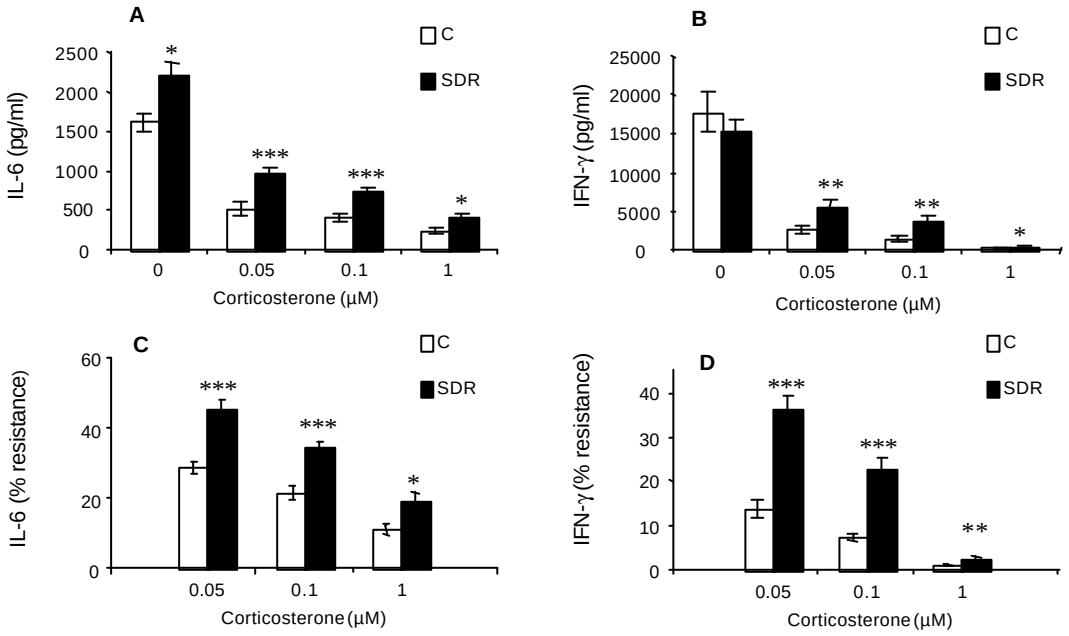


Fig.4: Corticosterone sensitivity in C and SDR mice. In vitro IL-6 (A, C) and IFN-γ (B, D) production in response to LPS in the presence of increasing doses of corticosterone were assessed. Data are presented as mean pg/ml ± sem (A, B) and in percent of the production at 0 μM of corticosterone (C, D). *p<0.05, *** p < 0.001.

muscular origin have also been observed after muscular exercise (Frost et al., 2002; Febbraio and Pedersen, 2002), making the increased physical activity or muscular tetany induced by stress other possible sources for elevated levels of plasma IL-6.

Splenomegaly and augmentation of the cell yield in the spleen are commonly associated to social stress in rodents (Klein et al., 1992; Stark et al., 2001; Avitsur et al., 2002b). In the present study, SDR also increased spontaneous splenocyte proliferation, which is supposed to reflect the proliferation activity that splenocytes display in live animals. This indicates that spleen cells were chronically activated over the duration of social stress. The effects of SDR on immune cells were further investigated by assessing the reactivity of spleen cells to mitogens. Reactivity of cells from the innate system was assessed by stimulating splenocytes with LPS. Social defeat increased cell proliferation and IL-6 production in response to LPS, in accordance with previous reports (Stark et al., 2001; Merlot et al., 2003). Production of IFN-γ was decreased whereas IL-10 was not affected. After LPS stimulation, IL-6 is mainly released by monocytes / macrophages. IFN-γ is mainly produced by Natural Killer (NK) and T cells, which respond to LPS indirectly via macrophage or dendritic cells (Gerosa et al., 2002; Kambayashi et al., 2003). *In vivo,* SDR has been shown to also increase the production of other inflammatory macrophage cytokines such as IL-1α and TNF-α (Quan et al., 2001). Taken together, these results indicate that SDR induces the release of proinflammatory cytokines by monocytes / macrophages, without any concomitant stimulation of IFN-γ producing cells.

In vivo, in response to an inflammatory stimulus, SDR can further facilitate the production of inflammatory mediators by decreasing the sensitivity of spleen cells to corticosterone (Quan et al., 2001). This relative state of resistance to glucocorticoids has been well-described in C57BL/6 mice (Stark et al., 2001; Quan et al., 2001; Avitsur et al., 2002a). It is site-specific since it occurs in spleen but not in peritoneal cells (Avitsur et al., 2002a). In the spleen, it affects specifically macrophages but not B lymphocytes (Stark et al., 2001). Molecular mechanisms sustaining corticosterone resistance are an impaired nuclear translocation of glucocorticoid receptor and a subsequent failure in blocking the activation of NF-κB pathway (Quan et al., 2003). In the present study, we confirmed that SDR decreases sensitivity to corticosterone in Balb/c mice, even though this effect was less important than in C56BL/6 mice.

Several studies point out the possibility that the activation of the innate system by stress could be responsible for the stress-induced reduction in T cell functions (Fleshner et al., 1998; Moraska et al., 2002). Stress can potentiate the release of several products of the innate system that can suppress lymphocytes functions. For example, stress favors the production of nitric oxide that suppresses lymphocyte proliferation (Coussons-Read et al., 1994) and of IL-1β that contributes to the impairment of humoral response to a KLH injection (Moraska et al., 2002). In the present study, proliferation of T-cells was assessed in response to Con A. Although statistically significant, the decreased proliferation in SDR group was negligible. This result is in accordance with the already described effect of social stress, which can either suppress or have no effect on spleen proliferation in response to Con A, depending on the model of stress (Raab et al., 1986; Hardy et al., 1990; Klein et al., 1992; Bartolomucci et al., 2001). Furthermore, the production of both IL-6 and IFN-γ were increased by SDR in concanavaline A stimulated cultures. From these results, it can be concluded that the proinflammatory state induced by SDR in spleen cells does not inhibit T lymphocyte activation.

In order to evaluate the influence of the inflammatory profile induced by SDR on the modulation of the Th1 / Th2 balance, levels of IFN-γ, IL-10 and IL-6 were measured in supernatants of Con A-stimulated spleen cells. The increase in IFN-γ and the decrease in IL-10 production in Con A-stimulated cultures are in favor of a shift toward a Th1 profile. This orientation of the cytokine balance is in accordance with other studies on social stress, even though the Th1 orientation in these reports was not due to an increase in Th1 cytokine production but to an inhibition of Th2 cytokines (Bartolomucci et al., 2001; de Groot et al., 2002). However, several results of the present experiment do not allow to conclude surely that SDR induced a Th1 shift. First, SDR induced an important production of IL-6, which is a Th2 cytokine (Diehl and Rincón, 2002). Furthermore, SDR did not affect the development of humoral response against KLH. A clear Th1 profile should have been accompanied by a decreased antibody production. Such a decrease is usually observed after social defeat (Bohus et al., 1993; de Groot et al., 2002). De Groot et al (2002) found that antibody secretion was only reduced in wounded subjects. It is therefore possible that we did not observed any effect of SDR because we did not distinguished not wounded from wounded mice.

In the present study, the Th1/Th2 profile of spleen cells was studied *in vitro*, in absence of corticosterone. *In vivo,* cells are in presence of glucocorticoids, which favor the production of

Th2 cytokines (Ramírez et al., 1996). In order to test whether resistance of splenocytes to glucocorticoids could reduce the influence of the hormone on the Th1/Th2 balance, the ability of corticosterone to inhibit the production of the Th1 cytokine IFN-γ by splenocytes was assessed *in vitro*. The reduced sensitivity of spleen cells to glucocorticoids resulted in higher levels of IFN-γ under the presence of corticosterone in SDR mice as compared to control mice. Though, corticosterone was less potent in inhibiting the production of Th1 cytokines in SDR than in control mice.

In conclusion, the present study confirmed that social defeat has a pro-inflammatory effect. In addition, this pro-inflammatory state was not associated with a Th2 shift but favored the production of Th1 cytokines.

Acknowledgements

This study was supported by INSERM, INRA and DGA (agreement n°00.060.00.470.75.01).

REFERENCES

Avitsur, R., Stark, J. L., Dhabhar, F. S., Padgett, D. A. and Sheridan, J. F.(2002a). Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. **124**, 54-61.

Avitsur, R., Stark, J. L., Dhabhar, F. S. and Sheridan, J. F.(2002b). Social stress alters splenocyte phenotype and function **132**, 66-71.

Barnard, C. J., Behnke, J. M. and Sewell, J.(1993). Social behaviour, stress and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of duration of grouping and aggressive behaviour prior to infection on susceptibility to *Babesi Microti*. **108**, 487-496.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A. E., Ceresini, G., Poli, M. D. and Parmigiani, S.(2001). Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependant. **73**, 401-410.

Black, P. H.(2002). Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. **16**, 622-653.

Bohus, B., Koolhaas, J. M., Heijnen, C. J. and de Boer, O.(1993). Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping habilities. **28**, 95-99.

Coussons-Read, M. E., Maslonek, K. A., Fecho, K., Perez, L. and Lysle, D. T.(1994). Evidence for the involvement of macrophage-derived nitric oxide in the modulation of immune status by a conditioned aversive stimulus. **50**, 51-58.

de Groot, J., Boersma, W. J. A., Scholten, J. W. and Koolhaas, J. M.(2002). Social stress in male mice impairs long-term antiviral immunity selectively in wounded subjects. **75**, 277-285.

DeKruyff, R. H., Fang, Y. and Umetsu, D. T.(1998). Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. **160**, 2231-2237.

Diehl, S. and Rincón, M.(2002). The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **39**, 531-536.

Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P.(1999). Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. **10**, 359-368.

Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K.(2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. **16**, 1335-1347.

Fleshner, M., Hermann, J., Lockwood, L. L., Laudenslager, M. L., Watkins, L. R. and Maier, S. F.(1995). Stressed rats fail to expand the CD45RC+CD4+ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN-gamma. **9**, 101-112.

Fleshner, M., Nguyen, K. T., Cotter, C. S., Watkins, L. R. and Maier, S. F.(1998). Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity. **275**, R870-R878.

Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H.(2002). Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. **283**, R698-R709.

Gerosa, F., baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. and Trinchieri, G.(2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. **195**, 327-333.

Hardy, C.-A., Quay, J., Livnat, S. and Ader, R.(1990). Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. **47**, 1245-1251.

Iwakabe, K., Shimada, M., Ohta, A., Yahata, T., Ohmi, Y., Habu, S. and Nishimura, T.(1998). The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **62**, 39-43.

Kambayashi, T., Assarsson, E., Lukacher, A. E., Ljunggren, H. G. and Jensen, P. E.(2003). Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. **170**, 2399-2408.

Kitamura, H., Konno, A., Morimatsu, M., Jung, B. D., Kimura, K. and Saito, M.(1997). Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. **238**, 707-711.

Klein, F., Lemaire, V., Sandi, C., Vitiello, S., Van der Logt, J., Laurent, P. E., Neveu, P. J., Le Moal, M. and Mormède, P.(1992). Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. **50**, 723-731.

LeMay, L. G., Vander, A. J. and Kluger, M. J.(1990). The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. **47**, 957-961.

Liège, S., Moze, E., Kelley, K. W., Parnet, P. and Neveu, P. J.(2000). Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in IL-1 -converting enzyme-deficient mice. **7**, 189-194.

Merlot, E., Moze, E., Dantzer, R. and Neveu, P. J.(2002). Suppression of restraint-induced plasma cytokines in mice pretreated with LPS. **5**, 131-135.

Merlot, E., Moze, E., Dantzer, R. and Neveu, P. J.(2003) Importance of skin injuries in the immune effects of social defeat. Submitted.

Moraska, A., Campisi, J., Nguyen, K. T., Maier, S. F., Watkins, L. R. and Fleshner, M.(2002). Elevated IL-1beta contributes to antibody suppression produced by stress. **93**, 207-215.

Nukina, H., Sudo, N., Aiba, Y., Oyama, N., Koga, Y. and Kubo, C.(2001). Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. **115**, 46-52.

Padgett, D. A., Sheridan, J. F., Dorne, J., Berntson, G. G., Candelora, J. and Glaser, R.(1998). Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. **95**, 7231-7235.

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J. L., He, L., Lai, W., Dhabhar, F. S. and Sheridan, J. F.(2003). Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. **137**, 51-58.

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J. L., He, L., Shah, M., Caligiuri, M., Padgett, D. A., Marucha, P. T. and Sheridan, J. F.(2001). Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. **115**, 36-45.

Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormède, P., Taghzouti, K., Simon, H. and Le Moal, M.(1986). Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. **36**, 223-228.

Ramírez, F., Fowell, D., Puklavec, M., Simmonds, S. and Mason, D.(1996). Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. **156**, 2406-2412.

Sacerdote, P., Manfredi, B., Gaspani, L. and Panerai, A. E.(2000). The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. **95**, 2031-2036.

Sheridan, J. F., Stark, J. L., Avitsur, R. and Padgett, D. A.(2000). Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. **917**, 894-904.

Stark, J. L., Avitsur, R., Padgett, D. A., Campbell, K. A., Beck, F. M. and Sheridan, J. F.(2001). Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. **280**, R1799-R1805.

Stefanski, V. and Engler, H.(1999). Social stress, dominance and blood cellular immunity. **94**, 144-152.

Stefanski, V., Peschel, A. and Reber, S.(2003). Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. **138**, 17-24.

Takaki, A., Huang, Q.-H. and Arimura, A. (1996). Is immobilization-induced plasma IL-6 elevation regulated by hepatic innervation? In Takashi Shimazu (Eds.), *Liver Innervation*, John Libbey & Company Ltd., London, pp. 221-226.

Takaki, A., Huang, Q.-H., Somogyvari-Vigh, A. and Arimura, A.(1994). Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. **1**, 335-342.

Zhang, D., Kishihara, K., Wang, B., Mizobe, K., Kubo, C. and Nomoto, K.(1998). Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of Listeria monocytogenes. **92**, 139-151.

Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., DePaoli, M. and Rabin, B. S.(1993). Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **133**, 2523-2530.

3ème chapitre : Conséquences immunes de la défaite sociale chez des souris infectées par la souche BCG de *M. bovis.*

Objectifs : Il a été montré au deuxième chapitre que la défaite sociale altère profondément le fonctionnement des splénocytes chez des animaux sains. Le but de la présente expérience était de déterminer les conséquences de ces altérations sur la résistance à une infection de type Th1. Pour cela, le stress de défaite sociale a été administré à des animaux préalablement infectés par la bactérie BCG. Nous nous sommes attachés (1) à décrire les effets de la défaite sociale sur la production *in vitro* d'IL-10, d'IFN-γ et d'IL-6 en réponse au LPS afin de comparer les effets du stress avec ceux de l'expérience précédente, (2) à déterminer *in vitro* si le stress affecte le développement de l'immunité spécifique en réponse au BCG et (3) à déterminer si ces altérations ont des conséquences sur la résistance à la bactérie *in vivo.*

Matériel et méthodes : Des souris ont été vaccinées par voie intra-veineuse avec la bactérie vivante BCG au jour 0. Du 11ème au 17ème jour, les animaux du groupe « défaite sociale » (SDR) ont subit 6 sessions de 2 heures de SDR. Pendant ces sessions, les animaux du groupe témoin étaient laissés dans leur cage dans une salle attenante. Les animaux ont été sacrifiés au jour 25. La sensibilité des splénocytes aux glucocorticoïdes et leur production d'IL-6, d'IFN-γ et d'IL-10 en réponse au LPS ont été mesurées. La réponse spécifique anti-BCG a été mesurée *in vitro* par le dosage de l'IL-6, l'IFN-γ et l'IL-10 produits par les splénocytes stimulés par de la tuberculine. Enfin, la résistance à la bactérie a été évaluée par la numération des CFU (colony forming units) bactériennes dans la rate.

Résultats : Le stress augmente la production d'IL-6 et d'IL-10 *in vitro* par les splénocytes en réponse au LPS (Fig.1A de l'article). On observe une tendance non significative à la diminution de la production d'IFN-γ. Le SDR n'affecte pas la sensibilité des splénocytes à la corticostérone (Fig. 4 de l'article). La production des trois cytokines en réponse à la tuberculine est similaire dans les groupes stressé et témoin (Fig.1B de l'article). La croissance bactérienne est également comparable dans les deux groupes (Fig. 2 et 3 de l'article).

Discussion et conclusion :

(1) Ce travail montre que les effets de la défaite sociale sur la production de cytokines durent relativement longtemps puisqu'ils sont toujours visibles 8 jours après la fin du stress. Ces effets sont qualitativement comparables à ceux observés chez des animaux non infectés (chapitre 2). D'un point de vue quantitatif, l'amplitude des effets du stress est plus faible dans cette expérience. Ceci peut être du au fait que les mesures ont été effectuées non le lendemain du dernier jour de stress, comme dans le chapitre 2, mais 8 jours plus tard.

(2) L'absence de résistance aux glucocorticoïdes peut s'expliquer également par le délai de 8 jours écoulé depuis la fin du stress. Il est aussi possible que l'activation des splénocytes par le BCG les ait rendus moins sensibles au stress et les ait empêché de développer une résistance aux glucocorticoïdes.

(3) Chez des animaux non-infectés (chapitre 2), le stress est en mesure de modifier la production d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ par les lymphocytes. En revanche, le stress n'affecte pas du tout la production de cytokines par les lymphocytes spécifiques de la tuberculine. Le SDR n'a pas influencé l'immunité acquise.

(4) En accord avec les résultats du chapitre 2, le SDR n'a pas d'effet sur la balance Th1/Th2.

(5) La réponse anti-BCG nécessite une réponse de type Th1. Du point de vue de l'immunité acquise, puisque que le SDR ne modifie pas l'équilibre Th1/Th2, l'absence d'effet du SDR sur l'immunité anti-BCG était un résultat attendu. Cependant, le SDR modifie également d'autres facteurs importants dans la réponse anti-BCG. Le stress aurait pu nuire à la réponse antibactérienne en altérant le système de l'immunité innée, non étudié ici. Puisque la croissance bactérienne est similaire dans les deux groupes, il est probable que le stress n'a pas inhibé non plus l'immunité innée.

Þ Chez des animaux dont la réponse primaire contre le BCG est déjà initiée, le stress de défaite sociale chronique altère la réponse à un mitogène non spécifique (le LPS) mais n'altère pas la réponse spécifique au BCG.

IMMUNE ALTERATIONS INDUCED BY SOCIAL DEFEAT DO NOT ALTER THE COURSE OF AN ON-GOING BCG INFECTION IN MICE.

Elodie Merlot, Elisabeth Moze, Robert Dantzer and Pierre J Neveu.

Neurobiologie Intégrative, INRA-INSERM, Institut François Magendie, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France.

Neuroimmunomodulation, sous presse.

Correspondance: Elodie Merlot, Tel.: +33.5.57.57.37.10. Fax: +33.5.56.98.90.29

E-mail: elodie.merlot@bordeaux.inserm.fr

ABSTRACT

The timing for applying stressor and primary immunization is known to influence the nature of the immune alterations induced by stress. The aim of the present study was to investigate the consequences of a stress occurring several days after the beginning of a primary infection on the host resistance. For this purpose, we investigated the effects of repeated social defeat on the immune response of mice infected with BCG eleven days before. In vitro production of cytokines in response to LPS or tuberculin, and the sensitivity of spleen cells to corticosterone were assessed 8 days after the end of the stress. Bacterial growth was assessed in the spleen.

We demonstrated that social defeat in BCG-infected mice induced a long-term increase in IL-6 and IL-10 production in response to LPS but did not modified the sensitivity of spleen cells to corticosterone. Stress did not affect the specific response to BCG, as shown by the production of cytokines in tuberculin-stimulated cultures. Accordingly, social defeat was unable to influence the mycobacterial growth in vivo. These results support the hypothesis postulating that stress does not affect antigen-specific response when it is applied after priming.

Key words : social defeat, BCG, interleukin-6, interleukin-10, interferon-γ, mice.

1. INTRODUCTION

Exposure to stress can alter many immune parameters, affecting both innate and acquired immunity. Several studies have tried to connect immune changes induced by stress with resistance to bacterial or viral infections [1-5]. Stress resulted either in an increase in the pathogen burden [4] or in an increased survival of animals and a better clearance of the pathogen [6]. In the same time, stress impaired several aspects of the immune response against the pathogen such as accumulation of mononuclear and polynuclear cells at the site of infection [6,7], specific cytotoxic activity of T lymphocytes [7] or antimicrobial activity of macrophages [5]. A shift in the Th1/Th2 cytokine balance did not occur systematically, since a decrease in the production of both Th1 and Th2 cytokine was reported [1-3].

The timing for applying stressor and primary immunization is known to influence the nature of the immune alterations induced by stress [8-10]. In studies using dead antigens, it has been proposed that stress could only alter the response of T cells to molecules for which they do not have any specific memory. Accordingly, a stress occurring at the very beginning of a primary response could inhibit naive T-cells, impairing the formation of memory T cells, but stress would be less effective if happening after priming [8]. Nevertheless a stress can occur at any time of an infectious process. Studies using live pathogens focused on two time points of the infectious process. Most of them used a stress occurring just before or simultaneously with the administration of a pathogen [1,3,11]. At this moment, the role of the innate system is crucial for containing microbial growth and initiating the antigen-specific response. Fewer studies showed that stress can reactivate a latent infection [12,13], at a time when the organism possesses numerous memory cells against the pathogen. The consequences of a stress occurring between these two time points have not been studied. The aim of the present study was to investigate the consequences of a stress occurring several days after the beginning of a primary infection. At this time, the initial non-specific response gives way to the developing primary specific response against bacteria. For this purpose, we investigated the effects of social defeat on the immune response of previously Calmette-Guérin bacillus (BCG)-infected mice.

Among the wide range of stress procedures commonly used in laboratory animals, social stress is one that can be the more easily related to a natural everyday life challenge. Social stress has been shown to alter the functioning of the immune system. Repeated social defeat

enhances interleukin-1 (IL-1), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) production in response to lipopolysaccharide and decreases the sensitivity of spleen macrophages to the anti-inflammatory effect of glucocorticoids [14,15]. Repeated defeat applied simultaneously with an influenza virus infection increases mortality, probably because of an excessive inflammatory response at the site of invasion [16]. A previous study in our laboratory has shown that repeated social disruption stress (SDR) does not only modify the inflammatory response but also affects T-cell functions. In non-infected mice, the levels of interferon-γ (IFN-γ), IL-10 and IL-6 released by spleen lymphocytes in response to a polyclonal mitogen were clearly affected by stress and favored the production of the Th1 cytokine IFN-γ [17].

A mycobacterial infection was used because it has been shown that stress can increase the susceptibility to mycobacteria of mice of the bcg sensible genotype [5,12] and because the immune response to mycobacteria is well characterized. Mycobacteria, including the Mycobacterium bovis BCG strain, are facultative intracellular pathogens that replicate within macrophages. Acquired resistance strongly depends upon macrophage activation by cytokines produced by T lymphocytes, including IFN-γ [18,19]. Then activated macrophages produce antimicrobial effector molecules such as nitric oxide and reactive nitrogen intermediates [20]. Apart IFN-γ, other cytokines play an important role in the regulation of the response to mycobacteria. IL-10, which is produced by macrophages and T-cells, possesses macrophage-deactivating properties and down-regulates the production of Th1 cytokines [21]. High levels of IL-6 produced by macrophages infected with mycobacteria suppress their ability to present efficiently antigens to T-cells [22].

In the present study, we investigated the effects of social disruption stress occurring several days after the initiation of the primary response to a BCG infection. In order to confirm whether the effects of SDR in BCG-infected mice were comparable to those reported in non-infected animals [17], the in vitro production of cytokines in response to LPS stimulation and the sensitivity of spleen cells to corticosterone were assessed. Cytokine production in response to tuberculin stimulation allowed measuring the influence of stress on specific immunity against BCG and the Th1/Th2 orientation. Bacterial growth was assessed in the spleen.

2. METHODS

2.1. Animals

Experimental animals were male BALB/c ByJ@Ico mice received from Charles River laboratories (St Germain sur l'Arbresle, France). They were 4-week old at arrival, and were randomly assigned in groups of four, housed in plexiglas cages in a temperature-controlled room (24 ± 1°C) with a 12 h light cycle (lights on 13:00-1:00 h). They were given free access to food and water, and were allowed to acclimate for 1 week before infection. The aggressive intruders used for SDR were old individually housed CD1 mice.

2.2. General procedures

The immune effects of social disruption stress (SDR) were tested in two independent experiments in BCG infected mice.

Experiment 1

A first experiment was conduced to assess whether SDR was able to affect the specific cytokinergic response against BCG. Mice were injected intravenously with 1.5 10^3 CFU of Calmette-Guérin Bacilli (intradermic BCG vaccine, Aventis Pasteur SA, France) suspended in 200 µl saline on day 0. The number of bacteria used for infection was confirmed by culturing dilutions of the vaccine onto 7H11 agar plates (Difco). Mice were left undisturbed in their cages until stress (SDR, n=26) or control (C, n=32) procedures, which took place from day 11 to day 17. Mice were sacrificed 8 days after the last SDR session (day 25 between 9:00 and 10:30). This delay was chosen to give enough time to an eventual effect of SDR on bacterial growth to develop and to reach detectable differences in bacterial load. Spleens were removed and were cut in two parts, one for CFU count and the other for cytokine production in LPS and tuberculin (PPD) stimulated cultures.

Experiment 2

Mice were infected with 1.5 10^3 CFU as described above on day 0 and underwent SDR (n=16) or C (n=16) treatments from day 11 to day 17. Mice were sacrificed on day 25. Spleens were removed for CFU count and assessment of sensitivity of splenocytes to corticosterone.

2.3. Social Disruption Stress (SDR) procedure

SDR animals underwent six SDR sessions (three days of stress, one day of rest, three additional days of stress) as previously described [14]. In each SDR session, a new older isolated aggressive male was introduced into the home cage of the group-housed subjects. Stress session lasted two hours and began between 13:00 and 14:00. Behavior was observed directly, and the intruder was replaced if he did not attack or if he was attacked by any of the residents. All residents showed submissive postures. Control mice remained undisturbed in their home cage. The protocol was approved by the local animal care committee.

2.4. Measures

In vitro cytokine production by spleen cells

Spleens were removed aseptically and dissociated in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Glasgow, UK). Addition of 2 ml of lysis buffer (0.28 M NH_4Cl, 0.02 M $KHCO_3$, 0.01 M EDTA) for 1 minute eliminated red blood cells. After three washes, viable mononuclear cells were counted using trypan blue dye exclusion, and adjusted to 2.10^7cells/ml in medium containing 5% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic antimycotic solution (Gibco). Spleen cell suspensions (4.10^6 cell/well) were added in 24-wells culture plates in a final volume of 1 ml in presence of 13 µg/ml lipopolysaccharide from E. coli (LPS, O127:B8 serotype, Sigma) or 20 µg/ml tuberculin (purified tuberculin (PPD), 2 000 000 UI/ml, Aventis Pasteur, France). The sensitivity of splenocytes to corticosterone was tested by cultivating cells ($2,5.10^5$cell/well) in 96-wells culture plates in a final volume of 250 µl in presence of 13 µg/ml LPS and increasing doses of corticosterone (Sigma). Corticosterone was diluted in ethanol at 0.01% final. Culture plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 hours, cell supernatants were harvested and frozen at –20°C until cytokine analysis.

Cytokine determinations

IL-10, IL-6 and IFN-γ were measured after adequate dilutions using sandwich ELISAs (BD Pharmingen). Intra and inter assay variability were 4% and 5% at 500 pg/ml for IL-10, 5% and 9% at 150 pg/ml for IL-6, and 8% and 8% at 550 pg/ml for IFN-γ. Assay ranges were 15.6 – 1000 pg/ml for IFN-γ and IL-6, and 31.3 – 2000 pg/ml for IL-10.

Fur condition score

As the immune consequences of SDR are suspected to be more pronounced in injured animals, an arbitrary index for fur condition was used to evaluate the severity of injuries as previously described [23]. The evaluation of the severity of injuries is more precise when the score is assessed several hours after SDR than immediately at the end of the session. For this reason, fur score was assessed juste before SDR sessions, from the second day of SDR (day 12) to the day after the last SDR session (day 18). Mice were attributed a score ranging from 1 to 4 by a blind observer. A score of 1 (fur well groomed and polished) or 1,5 (fur not so well polished) was attributed to mice that did not show any skin injury. The next levels were attributed to mice presenting scars: score 2 = a small number of marks or bristling on the fur and score 3 = numerous marks. The level 4 corresponded to the presence of one or more visible wounds, where the fur was obviously disrupted. A global score, resulting from the average of the score for each stress session, was used for analysis.

2.5. Statistical analysis

Results were analyzed for the effect of the main factor (C or SDR) by analysis of variance, using a repeated measures design for IL-6 production under increasing doses of CS. Fur score was taken into account by using a covariance analysis. Adequate transformations (log10 or square root) were used to homogenize the variances when necessary. The Tukey's test was used for post-hoc analysis.

3. RESULTS

Cytokine production by splenocytes stimulated by LPS or PPD is shown in Fig.1. In LPS stimulated cultures (Fig.1A), SDR increased the production of IL-6 by 20 % ($p<0.01$) and those of IL-10 by 21% ($p<0.01$) in comparison to controls. IFN-γ production was not affected ($p>0.1$). There was no difference in IL-6, IL-10 and IFN-γ production in response to PPD between control and stressed mice (Fig.1B).

SDR increased the number of skin injuries. SDR mice had higher fur score than C mice (2.32 ± 0.08 vs 1.13 ± 0.02). Covariance analysis revealed that fur score did not influence the production of cytokines in response to LPS or PPD.

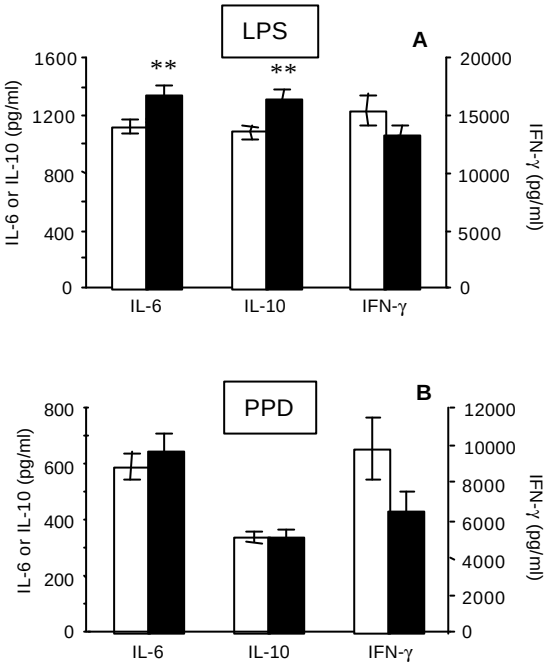


Fig.1: Cytokine production in C (open symbol) and SDR (black symbol) mice, 25 days after infection with BCG (experiment 1). Mice were infected on day 0 and stressed from day 11 to day 17. Splenocytes were cultured in the presence of LPS (A) or PPD (B). Data are presented as mean ± sem. **p<0.001

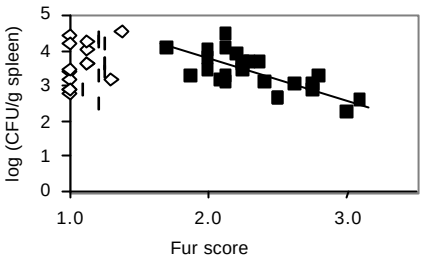


Fig.2: Spleen CFU in C (open symbol) and SDR (black symbol) mice, 25 days after infection with BCG (experiment 1). Results are expressed in logarithm of the number of CFU per g of spleen.

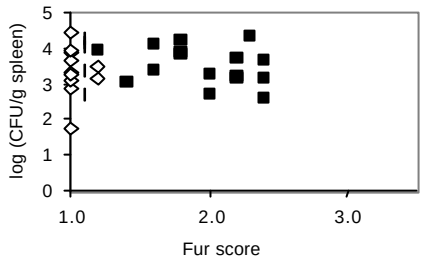


Fig.3: Spleen CFU in C (open symbol) and SDR (black symbol) mice, 25 days after infection with BCG (experiment 2). Results are expressed in logarithm of the number of CFU per g of spleen.

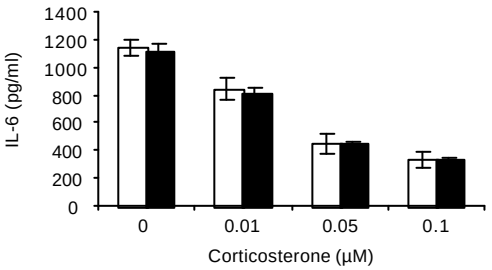


Fig.4: Corticosterone sensitivity in C (open symbol) and SDR (black symbol) mice (experiment 2). Sensitivity of splenocytes to corticosterone was assessed by measuring in vitro IL-6 production in response to LPS in the presence of increasing doses of corticosterone. Data are presented as mean ± sem.

CFU counts in the spleen of SDR and C mice are shown in Fig.2. The means of the two groups did not differ ($p>0.1$). However, using fur score as a covariant variable revealed a significant effect of fur score ($p<0.01$) and treatment ($p<0.05$) on CFU counts. Analysis per group showed that the number of CFU was negatively correlated with the fur score in the SDR group (correlation coefficient = -.33, $p<0.05$).

A second experiment was conduced to confirm the results of the first experiment, where occurrence of injuries seemed to impair bacterial growth, and to determine whether the sensitivity of spleen cells to corticosterone was decreased by SDR in BCG-infected mice. The counts of CFU in the spleen of SDR and C mice are shown in Fig.3. The means of the two groups did not differ ($p>0.1$). Grouping results from experiments 1 and 2 revealed that CFU counts were similar in the two experiments ($p>0.1$). Fur score was increased in SDR mice in comparison to C mice (1.96 ± 0.08 vs 1.06 ± 0.02). Grouping results from experiments 1 and 2 revealed that there was a significant effect of experiment ($p<0.01$). SDR mice were more injured in experiment 1 than in experiment 2 ($p<0.001$) and the effect of fur score on CFU counts was not significant in the second experiment ($p>0.1$).

Splenocyte sensitivity to CS in SDR and C mice previously infected with BCG is shown in Fig.4. In the absence of corticosterone, IL-6 production was similar in C and SDR groups. Addition of corticosterone decreased IL-6 production in a dose-dependent fashion ($p<0.001$) but there was no difference in responsiveness to CS between C and SDR mice.

4. DISCUSSION

In the present study, we investigated the effect of six sessions of social defeat, applied eleven days after infection, on the immune response to a BCG challenge. We demonstrated that social defeat in BCG-infected mice induced alterations in their in vitro cytokine production in response to LPS but did not modifie the sensitivity of spleen cells to corticosterone. SDR did not affect the specific response to BCG, as shown by the production of cytokines in tuberculin-stimulated cultures. Accordingly, SDR was unable to influence the mycobacterial growth in vivo.

Splenocyte reactivity was assessed 8 days after the end of the SDR sessions in BCG-infected mice. Our results show that SDR had long-lasting effects since the production of IL-6 and IL-10 in LPS-stimulated cultures was increased in SDR mice. This effect was not generalized to

all cytokines, since IFN-γ production was not affected. In a qualitative point of view, these results were similar to what was previously observed in non-infected mice [17,23] and confirm the enhancing influence of SDR on IL-6 production {147,170}. However, enhancement in IL-6 release seemed to be of a smaller extent 8 days after the stress than 1 day after, as reported previously [17].

SDR reduces the sensitivity of spleen cells to corticosterone in Balb/c mice [23]. When assessed one day after the end of SDR sessions, this effect can be easily detected by measuring IL-6 production in supernatants of spleen cell cultured with increasing doses of corticosterone. In the present experiment, a similar state of resistance to corticosterone was expected in stressed mice. This was not the case. Though, the influence of SDR on corticosterone sensitivity was less pronounced in this study than in other reports. The deterioration of fur condition attested for intense fights during stress sessions, and invalidates the possibility that the stress was not strong enough. Except the larger delay between the end of the SDR sessions and immune measures, the other difference with previous studies using SDR is that SDR was conduced on mice that have been infected by BCG for eleven days. It is possible that the presence of the infection reduced the sensitivity of spleen cells to stress, inhibiting the development of corticosterone resistance. Indeed the state of activation of immune cells can modulate their sensitivity to stress hormones. For example, macrophages respond differently to catecholamines whether they are resting or activated [24,25].

Further in vitro investigation revealed that splenocyte response to tuberculin was similar in control and stressed groups. Whether SDR had transient effects on tuberculin-specific response was not assessed in this study. However these results show that SDR did not have long-term effects on acquired immunity against BCG. This is in accordance with the hypothesis of a lack of effect of stress on antigen-specific response when it is applied after priming. As hypothesized by Kusnecov and Rabin [8], this could result from a lower sensitivity to stress hormones of activated and memory T-cells than naive cells.

Bacterial growth in the spleen was not affected by SDR. In experiment 1, analysis of covariance suggested that SDR could impair bacterial growth in mice that have been the most severely injured. However this result was not replicated in the second experiment. Although assessment of fur condition revealed that the two experiments differed in the intensity of SDR, the result from the second experiment strongly suggests that the correlation with the fur score in the first experiment was casual. Anyway, as mean CFU numbers were comparable in

SDR and C mice in both experiments, it is possible to conclude that the effect of SDR, if it exists, did not influence the BCG growth in a significant manner. Though, similar bacterial growth in C and SDR mice was coherent with the lack of effect of SDR on tuberculin-specific T-cells, and confirmed that SDR neither boost nor impaired the resistance to BCG.

Finally, this work showed that SDR induced long-lasting alterations in spleen cells functions but did not affect the host resistance to BCG. These results support the hypothesis postulating that stress does not affect antigen-specific response when it is applied after priming.

Acknowledgements

This study was supported by INSERM, INRA and DGA (agreement n°00.060.00.470.75.01).

REFERENCES

1. Dobbs C, Feng N, Beck FM & Sheridan JF: Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. J Immunol 1996; 157: 1872-1877.

2. Brenner GJ & Moynihan JA: Stressor-induced alterations in immune response and viral clearance following infection with herpes simplex virus-type 1 in BALB/c and C57B1/6 mice. Brain Behav Immun 1997; 11: 9-23.

3. Zhang D, Kishihara K, Wang B, Mizobe K, Kubo C & Nomoto K: Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol 1998; 92: 139-151.

4. Cao L, Filipov N & Lawrence DA: Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol 2002; 125: 94-102.

5. Brown DH & Zwilling BS: Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. J Neuroimmunol 1994; 53: 181-187.

6. Hermann G, Tovar CA, Beck FM, Allen C & Sheridan JF: Restraint stress differentially affects the pathogenesis of an experimental influenza viral infection in three inbred strains of mice. J Neuroimmunol 1993; 47: 83-94.

7. Bonneau RH, Sheridan JF, Feng N & Glaser R: Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms. J Neuroimmunol 1993; 42: 167-176.

8. Kusnecov AW & Rabin BS: Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. J Neuroimmunol 1993; 44: 33-42.

9. Moynihan JA, Ader R, Grota LJ, Schachtman TR & Cohen N: The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. Brain Behav Immun 1990; 4: 1-12.

10. Flint MS, Valosen JM, Johnson EA, Miller DB & Tinkle SS: Restraint stress applied prior to chemical sensitization modulates the development of allergic contact dermatitis differently than restraint prior to challenge. J Neuroimmunol 2001; 113: 72-80.

11. Lawrence DA, Cao L & Law: Suppression of host resistance to Listeria monocytogenes by acute cold/restraint stress: lack of direct IL-6 involvement. J Neuroimmunol 2002; 133: 132-143.

12. Brown DH, Miles BA & Zwilling BS: Growth of Mycobacterium tuberculosis in BCG-resistant and -susceptible mice: establishment of latency and reactivation. Infect Immun 1995; 63: 2243-2247.

13. Padgett DA, Sheridan JF, Dorne J, Berntson GG, Candelora J & Glaser R: Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. Proc Nat Acad Sci USA 1998; 95: 7231-7235.

14. Stark JL, Avitsur R, Padgett DA, Campbell KA, Beck FM & Sheridan JF: Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001; 280: R1799-R1805.

15. Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Shah M, Caligiuri M, Padgett DA, Marucha PT & Sheridan JF: Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. J Neuroimmunol 2001; 115: 36-45.

16. Sheridan JF, Stark JL, Avitsur R & Padgett DA: Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. Ann N Y Acad Sci 2000; 917: 894-904.

17. Merlot E, Moze E, Dantzer R & Neveu PJ: Cytokine profile during social defeat in mice. Submitted.

18. Orme IM, Andersen P & Boom WH: T cell response to Mycobacterium tuberculosis. J Infect Dis 1993; 167: 1481-1497.

19. Flynn JAL & Chan J: Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001; 19: 93-129.

20. Flesch IE & Kaufmann SHE: Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. Infect Immun 1991; 59: 3213-3218.

21. Trinchieri G: Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). Curr Opin Immunol 1997; 9: 17-23.

22. VanHeyningen TK, Collins HL & Russell DG: IL-6 produced by macrophages infected with Mycobacterium species suppresses T cell responses. J Immunol 1997; 158: 330-337.

23. Merlot E, Moze E, Dantzer R & Neveu PJ: Importance of fighting in the immune effects of social defeat. Submitted.

24. Weatherby KE, Zwilling BS & Lafuse W: Resistance of macrophages to Mycobacterium avium is induced by alpha2-adrenergic stimulation. Infect Immun 2003; 71: 22-29.

25. Boomershine CS, Lafuse W & Zwilling BS: Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits nitric oxide generation by Mycobacterium avium infected macrophages. J Neuroimmunol 1999; 101: 68-75.

4ème chapitre : Influence du statut social sur la réactivité à un stress social ou immunitaire.

Objectifs : Les études précédentes ont montré qu'une perturbation de l'environnement social et particulièrement la défaite sociale entraînent des réponses endocriniennes et immunitaires importantes chez la souris. L'objectif de cette étude était de déterminer si l'environnement social continue à influencer la réactivité endocrinienne et immunitaire lorsque la structure sociale est stabilisée. Nous avons cherché à déterminer si, pour des souris mâles logées en groupe, les statuts de dominant, d'intermédiaire ou de dominé sont associés à une réactivité endocrinienne et immunitaire particulière en conditions basales, lors d'un stress social (SDR) et lors d'une stimulation immunitaire (une infection par le BCG).

Matériel et méthodes : Le statut social des souris au sein de chacune des cages a été évalué par un test de compétition alimentaire. Dans une première expérience, les taux de cortisol plasmatique, la prolifération des lymphocytes spléniques et leur production d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ *in vitro* ont été mesurés chez des animaux non dérangés et après six sessions de SDR. L'état du pelage a été aussi mesuré afin d'évaluer l'intensité des blessures infligées lors du stress. Dans une deuxième expérience, l'aptitude de chacune des catégories sociales à développer une réponse spécifique contre la bactérie BCG a été évaluée en mesurant la production d'IL-10 et d'IFN-γ *in vitro* en réponse à la tuberculine et en comptant le nombre de bactéries présentes dans la rate. Les mesures ont été effectuées chez des animaux non infectés 21 et 94 jours après infection.

Résultats : Dans le groupe témoin, les niveaux de corticostérone plasmatique sont plus élevés chez les animaux de rang intermédiaire ou dominant que chez les dominés (Fig. 3 de l'article). En revanche, les variables immunitaires ne sont pas affectées par le rang social.

Dans le groupe subissant la défaite sociale, les niveaux de corticostérone plasmatique augmentent de façon identique dans les trois catégories d'animaux (Fig. 3 de l'article). Cependant, les dominants présentent plus de blessures (Fig. 2 de l'article) et sont les seuls à montrer un accroissement significatif de la prolifération des splénocytes après le stress (Fig. 4 de l'article) en comparaison des dominés. La production de cytokines n'est pas affectée par le statut social.

Vingt-et-un jours après l'infection par le BCG, la production d'IL-10 et d'IFN-γ en réponse à la tuberculine est d'autant plus grande que le statut social des animaux est élevé (Fig. 5 de l'article). L'influence du statut n'est plus visible 94 jours après l'infection. Par contre, aucune différence entre les trois catégories d'animaux n'est observée au niveau de la croissance bactérienne dans la rate (tableau 1 de l'article).

Conclusion :

(1) En réponse au stress de défaite sociale, le statut social a une valeur prédictive en ce qui concerne l'importance des blessures infligées à l'animal et l'accroissement de la prolifération lymphocytaire : les dominants semblent plus affectés que les animaux de rang inférieur.

(2) L'influence du statut social peut être étendue à des stress de nature non sociale puisqu'il affecte le développement de l'immunité spécifique anti-BCG. Ces différences, peut-être dues à une différence de cinétique lors du développement de l'immunité spécifique, ne sont cependant pas associées à des différences de susceptibilité à l'infection.

Þ Dans un groupe stable, le rang social occupé par un individu module sa réactivité endocrinienne et immunitaire. En particulier, les dominants semblent plus affectés que les intermédiaires et les dominés par la défaite sociale.

SOCIAL RANK ASSESSED IN A FOOD COMPETITION TEST INFLUENCES REACTIVITY TO IMMUNE AND SOCIAL STRESS IN MICE.

Elodie Merlot, Elisabeth Moze, Alessandro Bartolomucci, Robert Dantzer and Pierre J Neveu.

Neurobiologie Intégrative, INRA, Institut François Magendie, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France.

Brain, Behavior, and Immunity, sous presse.

Correspondance: Elodie merlot, Tel.: +33.5.57.57.37.10. Fax: +33.5.56.98.90.29

E-mail: elodie.merlot@bordeaux.inserm.fr

ABSTRACT

Social position is a source of inter-individual variability in a large number of animal species. The purpose of this study was to determine if individual differences observed at the endocrine, and immune levels in mice can be partly explained by social rank, in a stable undisturbed group as well as in the context of stress. The influence of rank was assessed in stable undisturbed groups, and in response to a social (repeated defeat) and non social (a Calmette Guerin bacilli (BCG) injection) challenges. Endocrine and immune correlates of social rank were assessed by measuring plasma corticosterone levels, splenocyte proliferation and cytokine production.

In undisturbed groups, plasma levels of corticosterone were lower in subordinate than in intermediate and dominant mice. Splenocyte proliferation and *in vitro* cytokine production were independent from social rank. In response to social stress, corticosterone increased similarly in every social category. However, fighting-induced scars and increase in splenocyte proliferation were more pronounced in dominant animals. In response to a BCG challenge, social rank influenced the *in vitro* production of Il-10 and IFN-γ in response to tuberculin during the acute phase of the infection but not at the end of the infection. However, these observations were not correlated to spleen bacterial growth. These results indicate that a part of individual differences in social but also in non-social challenges are associated with different social rank.

Keywords: social rank; social stress; susceptibility to infection; cytokines; corticosterone; mice.

1. INTRODUCTION

Individuals are not equal with regard to vulnerability to stress (Segerstrom et al., 2001) but the factors involved in this heterogeneity remain to be clarified. The impact of a stressor depends on the ability of the organism to cope with the situation. Several behavioral traits such as aggressiveness (Benus et al., 1991; Fokkema et al., 1995; Van Loo et al., 2001), coping styles (Koolhaas et al., 1999; Stowell et al., 2001; Geverink et al., 2002) and behavioral lateralization (Neveu., 1996) influence behavioral, neuroendocrine and immune responses to stress. Expressing the result of the interaction between social environment and individual characteristics, social rank could also be a pertinent predictor of inter-individual variability in coping ability. Social rank integrates many features, including cognitive capacities (Barnard and Luo., 2002), and neuroendocrine activity (Ely and Henry., 1978; Schuhr., 1987; Haemisch et al., 1994). Social rank also accounts for differences in susceptibility to various diseases (Ebbesen et al., 1991; Barnard et al., 1996; Smith et al., 1996; Schuster and Schaub., 2001). However, the immune mechanisms responsible for these differences remain unknown.

Social context can influence the way an animal perceives and reacts to its environment. In stable groups of adult mice, social relationships can be assessed in different ways (Lindzey et al., 1961; Benton et al., 1980; Drews., 1993). Usually definition of dominance is based on territorial ownership and aggressiveness, and it uses tests based on the outcome of agonistic encounters (Benton et al., 1980; Schuhr., 1987; Vekovishcheva et al., 2000). The definition of dominance as a priority of access to a resource has led to use competition tests that do not necessarily require agonistic interactions (Fredericson., 1950; Lindzey et al., 1961; Lee and Craig., 1982). A method consists in confronting the animals of a group in a competitive situation for a desirable object. A classification of cage-mates can be obtained by considering all the possible dyads of animals in the group, and by determining in each dyad who had priority of access to the resource. Such a method, using food as resource, has been used in several species including mice (Aubert., 2001), chicken (Lee and Craig., 1982) or pigs (Hessing et al., 1994; de Jong et al., 2001). Data from literature suggest that food competition test could be a pertinent way of dissociating animals of different coping styles. Indeed the score obtained in this test has been reported to be correlated with several behavioral and biological variables such as emotionality and spatial performances (Aubert., 2001), heart rate response to stress (de Jong et al., 2001), and disease susceptibility (Hessing et al., 1994).

The purpose of the present study was to determine if individual differences observed at the endocrine and immune level in mice can be partly explained by the social rank assessed in a food competition test, in a stable undisturbed group as well as in the context of stress. In this study, endocrine and immune correlates of social rank were assessed by measuring plasma corticosterone and immunoglobin, splenocyte proliferation, and cytokine production. The influence of social rank was first investigated in two social situations: (1) in a stable undisturbed group, and (2) in the context of social stress. Social disruption was used because it strongly affects cytokine balance (Stark et al., 2001; Avitsur et al., 2002a). The influence of social rank was also investigated in a situation that *a priori* did not involve any social element, such as the response to a microbial challenge. Mice were challenged with Calmette-Guérin Bacilli (BCG) and the course of infection and specific cytokine response to the bacteria were followed for 94 days.

2. METHODS

2.1. Animals

Male BALB/c ByJ@Ico mice were purchased from Charles River laboratories (St Germain sur l'Arbresle, France). They were 5-week old at arrival, and were randomly regrouped in cages of five mice (23 x 16 cm), housed in a temperature controlled room (24 ± 1°C) with a 12 h light cycle (lights on 13:00-1:00 h). They were given free access to food and water, and were allowed to acclimate and establish a stable social hierarchy for 3 weeks.

2.2. Treatments

Experiment 1: Influence of social rank on reactivity to social disruption stress

Cages of mice were randomly assigned in control (C) or social disruption stress (SDR) groups. Mice were tested for their rank in the food competition test over a one month period, and were let undisturbed in their home-cage for ten days before the beginning of stress treatments. Just before the first SDR session, animals were intraperitoneally injected with 100 µg keyhole-limpet hemocyanin (KLH, Sigma) in 0.5 ml saline, to assess antigen-specific humoral response. Stress treatments were administered from day 1 to day 7, and animals were sacrificed on day 8. Mice were housed with their four initial cage-mates during the all experiment. Stressed animals (n=35) underwent six SDR sessions (3 days of stress, 1 day of rest, 3 additional days of stress) as previously described (Stark et al., 2001). During each

session, a new older isolated aggressive male was introduced into the home cage of the five cage-mates. SDR sessions lasted for two hours and took place between 13:00 and 16:00. Behavior was observed directly, and the intruder was replaced if it did not attack or was attacked by any of the residents. All residents showed submissive postures. Control mice (n=30) remained undisturbed in their home cage.

Samples of approximately 50 µl of blood were collected from the retroorbital plexus for corticosterone assay, as a measure of stress. The first sample occurred in basal conditions one week before the beginning of the SDR procedure (at day –7) and the second one immediately after the last SDR session (day 7). Blood samplings took place between 15:00 and 16:00. Plasmas were frozen at –20°C until analysis. Animals were sacrificed between 9:00 and 10:30, eighteen hours after the last stress session. Trunk blood was collected for anti-KLH immunoglobulin assay and spleens were removed for cytokine and cell proliferation assays.

Experiment 2: Influence of social rank on reactivity to a BCG challenge

Groups of mice were tested for their rank in the food competition test over a one month period, and were left undisturbed for two weeks before the injection of BCG. Mice were sacrificed 21 days (n=35) or 94 days (n=30) after infection. They were housed with their initial cage-mates during the all experiment and the mice from one cage were all sacrificed at the same time. Animals were injected intravenously with 1.5 10^3 CFU of Calmette-Guérin Bacilli (intradermic BCG vaccine, Aventis Pasteur SA, France) suspended in 200 µl saline. The number of bacteria used for infection was confirmed by culturing dilutions of the vaccine onto 7H11 agar plates (Difco). Balb/c is a sensible strain to BCG, and the mycobacterium can grow in the animal for several weeks before being eliminated (Gros et al., 1981; Forget et al., 1981). Preliminary experiments showed that Day 21 corresponded to a phase of exponential bacterial growth in the spleen, when in vitro cytokine specific response against tuberculin was just beginning. Day 94 corresponded to the latent phase of the infection, when specific immunity against BCG was fully acquired. In parallel, control mice (n=18) were sacrificed 21 to 35 days after saline injection. These animals were regrouped in a group called “day 0”. Fur state was checked regularly, as an indicator of general health and of social stability. Social rank was tested again between the 5th and the 12th week of infection. This allowed to verify that infection and ageing did not interfere with social hierarchy. Mice were sacrificed between 9:00 and 10:30 a.m., spleens were removed and were cut in two pieces for cytokine assay and CFU count.

2.3. Food competition test

The test implied a competition between cage-mates for a highly appetitive food pellet (a small piece of vanilla cookie) after 12 hours of food deprivation. The group was transferred in the test area several hours before the test for habituation to the new environment. The test was performed through the analysis of dyadic encounters between cage mates in the test area, while the other mice of the group remained in the home-cage. Each mouse was exposed to four paired comparisons, so that it met all its cage-mates successively (Lee and Craig., 1982). The test situation involves a motivational conflict: the animal evaluates the cost / benefit ratio between approaching the palatable food and avoiding potential aggression from the rival. Dominance within a pair was assessed by the ratio of food handling by the protagonists. Agonistic interactions occurred very rarely during the test. An index (X) ranging from 1 to 5 was calculated from the resultants of pair comparisons: $X=(D-S+N+1)/2$, where D is the number of individuals dominated by the subjects, S is the number of individuals which supplanted the subject and N is the group size. The test was performed at least twice for each cage in a 3-4 week period. The mean score of these sessions was used as the definitive index. A given subject was considered as 'dominant' when $X \geq 4$ (i.e. monopolysing the pellet in all or almost all encounters), and as 'subordinate' if $X \leq 2$ (i.e. never or almost never gaining access to the food pellet). Otherwise it was considered as 'intermediate' (i.e., approximately equally winner or looser in the different encounters). Population repartition according to the index is described in Fig. 1. Among the 26 groups tested, one that showed unstable test results and high levels of aggression was excluded from the study. In experiment 2, the stability of the rank in the food competition test was tested in groups that were kept until day 93. The correlation between rank indexes before and during infection was 0.73 ($p<0.001$).

2.3. Biological determinations

Fur condition

An arbitrary index for fur condition inspired from Barnard and collaborators (1996) was used to evaluate the intensity of fights each mouse underwent during the six SDR sessions. Immediately after the SDR session, all mice were bristled. Preliminary observations showed that the severity of injuries was better evaluated by scoring mice several hours after SDR, when mice could have groomed. For this reason, fur score was assessed before SDR sessions on days 2 to 7. Mice were attributed a score ranging from 1 to 4 by a blind observer. The four

levels were: fur well groomed (1), marks or bristling on the fur (2), more numerous marks (3), one or more obvious visible wounds or lack of hair (4). A global score, resulting from the average of the score for each SDR session, was used for analysis.

Plasma corticosterone levels

Plasma corticosterone levels were measured following ethanol extraction by a radiocompetitive binding assay using rhesus monkey transcortin, [^{3}H]corticosterone as the tracer, and dextran-coated charcoal as the adsorbent of free radioactivity (Liège et al., 2000). Inter- and intra-assay coefficients of variation were 14 and 7% respectively. Assay range was 7.8 – 1000 ng/ml. All samples were assayed in a single assay.

Cell proliferation assay

Spleens were removed aseptically and dissociated in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Glasgow, UK). Red blood cells were eliminated by addition of 2 ml of lysis buffer (0.28 M NH_4Cl, 0.02 M $KHCO_3$, 0.01 M EDTA) for 1 minute. After three washes, viable mononuclear cells were counted using trypan blue dye exclusion, and adjusted to 2.10^7cells/ml in medium containing 5% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic antimycotic solution (Gibco). Cells were cultured in triplicates (2.10^5cell/well) in flat-bottom 96-wells plates in the presence of 13 µg/ml of LPS in a final volume of 150 µl. After 72 hours, 0.5 µCi/well of [H^3]thymidine (specific activity 5Ci/mmol, CEA, France) was added in a volume of 50 µl for 24 hours. Cells were collected on fiberglass strips using a multiple harvester, and radioactivity determined in a liquid scintillation counter. The results were expressed in cpm.

In vitro cytokine production

Spleen cell suspensions (4.10^6cell/well) were cultivated in 24-wells culture plates in a final volume of 1 ml. For experiment 1, cells were cultivated in presence of 13 µg/ml of lipopolysaccharide from *E. Coli* (LPS, O127:B8 serotype, Sigma). For experiment 2, they were cultivated in presence of 20 µg/ml of tuberculin (purified tuberculin (PPD), 2 000 000 UI/ml, Aventis Pasteur, France). Culture plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 hours of incubation, cell supernatants were harvested and frozen at –20°C until cytokine analysis.

Cytokines and anti-KLH antibody assays

Interleukin-10 (IL-10) as anti-inflammatory cytokine, and interleukin-6 (IL-6) and interferon gamma (IFN-γ) as pro-inflammatory cytokines, were measured after adequate dilutions using sandwich ELISA (BD Pharmingen). For IFN-γ, intra and inter assay variability were 8% at 550 pg/ml. For IL-10, intra assay variability was 4% and inter assay variability was 5% at 500 pg/ml. For IL-6, intra assay variability was 5% and inter assay variability was 9% at 150 pg/ml. Assay ranges were 15.6 – 1000 pg/ml for IFN-γ and IL-6, and 31.3 – 2000 pg/ml for IL-10.

Anti-KLH gamma immunoglobulins (IgG) were measured by direct ELISA (Sacerdote et al., 2000). Mice sera were diluted 1:10, 1:25 and 1:50 in phosphate buffered saline/Tween. Alkaline-phosphate-conjugated goat anti-mouse IgG (chain specific, Sigma) diluted 1:12000 in PBS/Tween was used as detection antibody. Colorimetric reaction was obtained after adding p-nitrophenyl-phosphate substrate (ready to use, Sigma).

BCG growth

The growth of BCG was monitored by counting bacteria in the spleen. Half-spleens were weighted and homogenized in 0.5 ml phosphate buffered saline (PBS). Homogenates were plated in triplicates on Middlebrook 7 H11 agar (Difco) and incubated for 3 weeks at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. The number of bacteria was estimated by counting colonies that grew on the medium, assuming that a colony-forming unit (CFU) corresponds to one founder bacterium. Results were expressed in CFU/g of spleen.

2.4. Statistical analysis

Results were analyzed by the General Linear Model procedure of SAS, using a split plot model. Treatment effect (C vs SDR) was analyzed in relation to inter-cages variability. Social rank and rank x treatment interaction were analyzed in relation to intra-cage variability. Scheffe's test was used for post-hoc analysis. When interaction between two factors was significant, data were analyzed separately for each factor level. Non significant factors were removed from the model. Plasma corticosterone was analyzed first with repeated measure ANOVA. As the effect of the repeated factor was significant, data were then analyzed separately for each level of the factor of repetition, using the split plot model described above.

Cytokines data (IL-10, IFN-γ and IL-6), splenocyte proliferation and spleen CFU were analyzed after a $\log_{10}$ transformation to equalize variances.

3. RESULTS

3.1. Influence of social rank on neuroendocrine and immune responses to social disruption.

The effect of rank on fighting-induced scar was scored in the SDR group (Fig.2). There was an effect of rank ($F_{2,87}=5.3$; $p<0.01$). Dominants had a fur score higher than subordinates ($p<0.01$). In the control group, none of the mice was wounded (fur score 1.1 ± 0.03).

Plasma levels of corticosterone (CS) were determined in two groups of animals. One group, subjected to SDR, was bled 7 days before SDR and just after the last session of stress (day 7). Undisturbed controls were bled at the same times. Repeated measures ANOVA revealed an effect of day ($F_{1,53}= 6.2$; $p<0.05$), a day x treatment interaction ($F_{1,53}= 35.1$; $p<0.001$), and a day x rank interaction ($F_{2,53}= 4.0$; $p<0.05$). At day –7, there was a social rank effect ($F_{2,58}=8.58$; $p<0.001$). CS concentrations were lower in subordinates than in dominants and intermediates ($p<0.01$). After SDR (day 7), there was an effect of SDR ($F_{1,58}=42.5$; $p<0.001$) and no rank effect. Analyzing C and SDR groups separately revealed that in control animals, there was an effect of day ($F_{1,27}= 8.6$, $p<0.01$; 28 ± 5 ng/ml on day –7 and 10 ± 3 ng/ml on day 7) and an effect of rank ($F_{2,27}=4.0$, $p<0.05$; 8 ± 2 ng/ml in subordinates, 24 ± 5 ng/ml in intermediates and 26 ± 6 ng/ml in dominants). In control animals, the effect of social rank was stable over time as there was no day x rank interaction. Figure 3 illustrates plasma levels of CS in the SDR group. In this group, effect of time was significant ($F_{1,26}=26.6$; $p<0.001$). Plasma levels of CS were higher on day 7 than on day -7 ($p<0.001$). At day -7, there was a rank effect ($F_{2,26}=4.3$; $p<0.05$). Plasma levels of CS were lower in subordinates as compared to dominants or intermediates ($p<0.05$). After SDR, there was no rank effect any longer. The increase in plasma CS observed after SDR in comparison to day –7 levels was significant only in subordinates ($p<0.001$) but not in intermediates and dominants.

The possible influence of social rank on the immune consequences of SDR was studied using various variables. Plasma levels of IgG anti-KLH antibodies were measured 7 days after immunization. There was no SDR effect, no rank effect, and no SDR x rank interaction (mean optical density at 405 nm 0.64 ± 0.4, at dilution 1/25). Splenocyte proliferation was measured

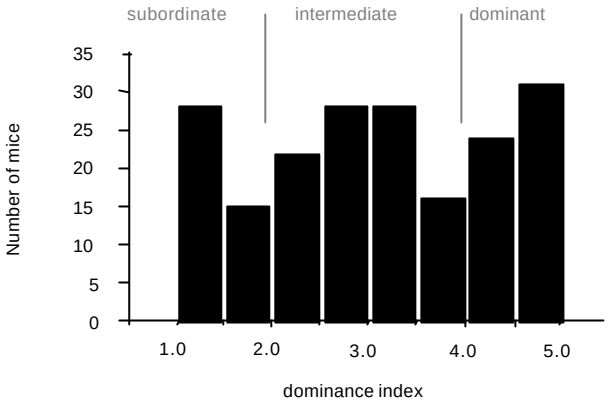


Fig. 1: Repartition of mice according to their dominance index. Six to fifteen-weeks old balb/c male housed in groups of five (n=195) were tested for their social rank according to the food competition test, and were attributed a score ranging from 1 to 5. A mice can be characterized as subordinate, intermediate or dominant according to his index, as shown in the figure above. This result was obtained by summing results from several experiments.

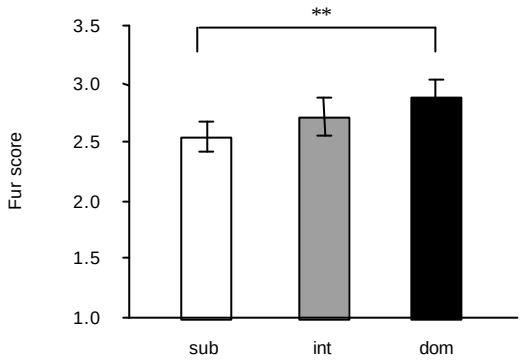


Fig. 2: Influence of social rank on fur score in the SDR group (experiment 1). Before each SDR session, mice were attributed a mark ranging from 1 (well-groomed fur) to 4 (visible wounds). An average fur score was calculated for the all SDR period, which reflects the intensity of fights that each animal underwent. Results are expressed in fur score ± sem. (** p<.01). Sub: subordinates, int: intermediates, dom: dominants.

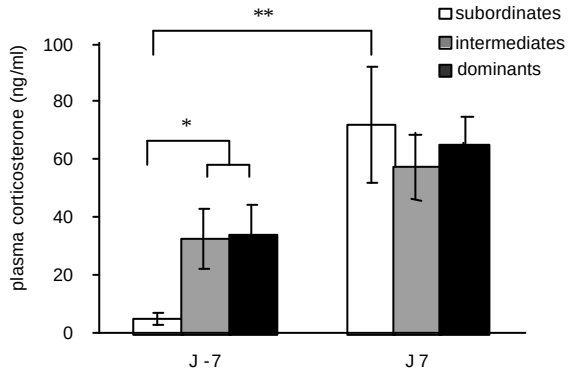


Fig 3: Influence of social rank on plasma corticosterone (experiment 1) in subordinate (n=10), intermediate (n=10) and dominant (n=10) mice of the SDR group. Samples were collected one week before the beginning of SDR stress (day -7) and just after the 6th SDR session (day 7). Results are expressed in ng/ml ± sem. (* p<.05; ** p<.01)

4 days after LPS stimulation (Fig. 4). Analysis performed for each rank separately revealed an effect of SDR in dominants ($F(1,19)=5.27$; $p<0.05$) but no effect in intermediates and subordinates. Only the dominants showed a higher proliferation than controls. Cytokine levels were measured in the surpernatant of LPS-stimulated spleen cells. For the production of IFN-γ, there was a SDR effect ($F(1,51)=4.5$; $p<0.05$), but no rank effect and no SDR x rank interaction. IFN-γ levels were lower in the SDR group as compared to controls (4200±639 pg/ml vs 6878±806pg/ml). For the production of IL-6, there was a SDR effect ($F(1,52)=10.0$; $p<0.01$), but no rank effect and SDR x rank interaction. Levels of IL-6 were increased in SDR group as compared to controls (1629±166 pg/ml vs 966±59 pg/ml). For IL-10, no effect of SDR nor rank was observed.

3.2. Influence of social rank on response to a mycobacterial infection.

Production of IFN-γ and IL-10 was measured in the supernatant of spleen cells stimulated with PPD. For IL-10 (Fig. 5A), there was a day effect ($F(2,64)=36.7$; $p<0.001$) and a day x rank interaction ($F(4,64)=7.4$; $p<0.001$). There was no rank effect in non-injected control animals. On Day 21, production of IL-10 was higher in dominants as compared to subordinates ($p<0.01$) or to intermediates ($p<0.05$). On Day 94, there was a rank effect ($F(2,28)=3.7$; $p<0.05$), production of IL-10 tended to decrease when rank increased. For IFN-γ (Fig. 5B), there was a day effect ($F(2,59)=83.0$; $p<0.001$), a rank effect ($F(2,59)=4.47$; $p<0.05$) and a day x rank interaction ($F(4,59)=3.41$; $p<0.05$). Concentrations of IFN-γ increased with time. There was no rank effect in non injected animals and on Day 93, but a rank effect on Day 21 ($F(2,19)=11.07$; $p<0.01$). At this time, like for Il-10, dominants produced more IFN-γ than intermediates ($p<0.05$) and subordinates ($p<0.05$), and intermediates tended to produce more IFN-γ than subordinates ($p=0.09$).

Mycobacterial infection was assessed by measuring the number of colony forming units (CFU) in the spleen. As shown in Table 1, CFU number was higher at 21 than at day 94 ($F(1,57)=5.5$; $p<0.05$). However, there was no rank effect and day x rank interaction.

4. DISCUSSION

The results of the present experiments show that in basal conditions, the rank measured in the food-competition test is associated with differences in plasma levels of corticosterone (CS)

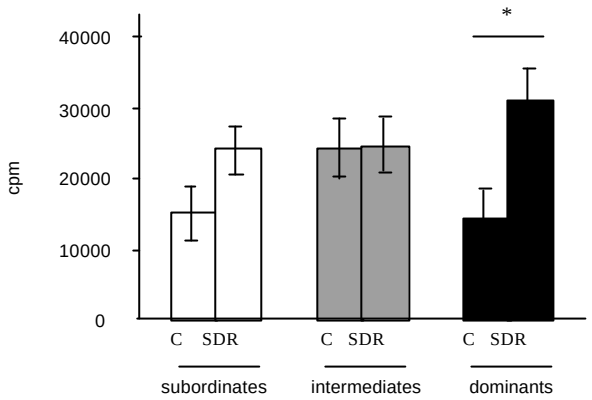


Fig 4 : Influence of social rank on splenocyte proliferation (experiment 1) after 4 days of LPS stimulation in SDR (sub n=10, int n=10, dom n=10) and control groups (sub n=8, int n=12, dom n=10). Results are expressed in cpm ± sem. (* p<.05)

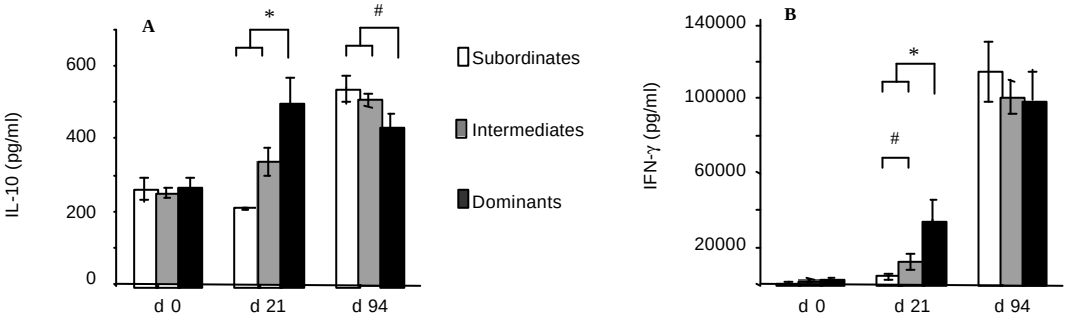


Fig. 5: PPD-induced in vitro IL-10 (A) and IFN-γ (B) production 0 (control group, n=18), 21 (n=20) and 94 days (n=29) after infection with 10^3 CFU of BCG (experiment 2). Spleen cell were cultured in 20 µg/ml of PPD for 3 days. Supernatants were assayed by ELISA. Results are expressed in pg/ml ± sem. (*: p<0.05; #: p<0.1)

and immunity. CS plasma levels were lower in subordinates than in dominants and intermediates. Splenocyte proliferation and cytokine production in response to LPS or tuberculin were not influenced by the rank. After social disruption stress, rank was related to fighting-induced scaring, dominants having a higher fur score. Social rank did not have any influence on the increase in plasma corticosterone levels, but influenced immune reactivity: only dominants showed a SDR-induced increase in splenocyte proliferation. After a BCG challenge, social rank influenced the *in vitro* production of IL-10 and IFN-γ in response to tuberculin, but was not linked to the number of CFU in the spleen.

4.1. Influence of social rank on basal endocrine and immune activities

We observed a clear relation between social rank and plasma corticosterone levels in basal conditions, with higher values in dominant mice and lower values in subordinate mice. Usually, when a higher HPA axis activity was reported in subordinates (Raab et al., 1986; Schuhr., 1987; Sachser and Lick., 1989; Fano et al., 2001), studies concerned situations where hierarchy was still establishing but not yet stable. In opposition, when stable social groups of mice were studied, no differences between ranks were usually found (Ely and Henry., 1978; Koyama and Kamimura., 2000; Van Loo et al., 2001). However, if we assume that the rank assessed in the food competition test is related to dominance, several studies in stable social groups are in accordance with our results. Haemisch et al. (1994) found that in an enriched environment, dominant mice had significantly higher CS levels than subdominants and subordinates males. In the same study, plasma titers between ranks were not statistically different in standard cages, but the profile of the three social categories was very similar to what was observed here (CS levels of dominants and intermediates were similar, but higher than those of subordinates). Significant differences between dominants and subordinates were observed in the study of Sheridan et al. (2000). Finally Schuster and Schaub (2001) also found that CS levels tended to increase when the rank increased, but this result was not statistically significant. A simple hypothesis can explain the presence of lower CS levels in subordinates than in dominants. When social organization becomes stable, frequency of agonistic interactions decreases and plasma corticosterone returns to normal concentrations (Ely and Henry., 1978; Fano et al., 2001). The stability confers predictability to each cage-mate, and the situation becomes less stressful (Vekovishcheva et al., 2000), especially for subordinate animals that do not engage in competition for a higher social rank. Intermediate rank mice are also named “subdominant” or “subdominant active”, because they sometimes

perform attacks against group members and contest the hierarchical organization (Haemisch et al., 1994). The dominant must repeatedly patrol and threat subdominants to confirm its dominance. Finally, in a stable group, the permanent vigilance of dominants to maintain subdominants in their position could represent a stress that induces high levels of CS in these two social categories.

Cytokine production (Il-10 and IFN) was independent of social rank in control groups of both experiments. Splenocyte proliferation and plasma IgG were not affected by social rank too. These data suggest that the immune system is not significantly affected by social rank in basal conditions.

4.2. Influence of social rank during social stress

In animals that underwent SDR stress, the intensity of fur injuries increased with social rank. Previous studies showed that dominant mice may be more aggressive and more active than subordinates when facing an intruder (Blanchard et al., 1988; Haemisch et al., 1994). This strategy could trigger in return aggression from the intruder, and therefore generate a greater number of injuries. Because of their immobility, non-aggressive mice would be less often attacked than the active and aggressive mice (Benus et al., 1991). Surprisingly, Avitsur et al. (2001) found that subordinates were more wounded than the other mice during SDR stress. In this study, animals that showed the more submissive postures during SDR were presumed to be the subordinates but the rank of animals before SDR was not assessed. Methods used to assess dominance were quite different to get definitive conclusions.

During an acute stress, subordinates usually have a higher HPA axis response than dominants (Ely and Henry., 1978; Fokkema et al., 1988; Fokkema et al., 1995). In the present experiment, we found that plasma CS levels were similar in all ranks after repeated stress sessions. Preliminary experiments that did not take into account social rank showed that CS response decreased between the first and the last SDR session (unpublished data), indicating an habituation of the HPA axis to SDR. It is possible that some individual differences were observable after the first SDR session, but disappeared after 6 repeated sessions because of habituation. However as subordinates had lower basal CS levels but reached the same level as individuals of the other ranks after stress, they globally showed a higher amplitude of reactivity to SDR than intermediates and dominants. This result should be in agreement with a higher HPA axis reactivity to stress in subordinates than in dominants.

In accordance with previous data, SDR stress increased *in vitro* LPS-induced IL-6 production (Stark et al., 2002), which is one of the main cytokines mediating systemic inflammation. The effect of SDR on the *in vitro* production of IFN-γ (a promoter of macrophage activation) or IL-10 (an inhibitor of macrophage functions) had not yet been studied. SDR decreased IFN-γ production and did not affect IL-10 levels, suggesting that SDR could affect macrophage functions. Social rank did not have any influence on stress-induced alterations in cytokine production. However social rank interfered with stress in splenocyte proliferation. Repeated social stress can induce an increase in splenocyte proliferation / viability (Bohus et al., 1993). This could reflect variations in the proportion of different cell populations in the spleen. Indeed, social stress can deeply modify the spleen cellular composition, reducing the percentage of lymphocytes and increasing the proportion of monocytes (Stefanski and Engler, 1999; Avitsur et al., 2002b). Only dominant mice showed an increase in splenocyte proliferation after SDR. In rats, effects of social stress on immune blood cell counts and their proliferation differed in defeated animals that displayed a lot of submissive postures and in those that had moderate defensive behavioral elements (Stefanski, 1998). The present results are comparable if it is assumed that dominants and subordinates probably did not show the same behavioral responses to the intruder. One possible cause for the more pronounced immune consequences of SDR stress in dominant mice is that social defeat is differently perceived by dominants as compared to subordinates. Indeed, our results can be compared to those of Bartolomucci et al. (Bartolomucci et al., 2001), who used the procedure of psychosocial stress, involving a daily confrontation between an intruder and a resident mouse for 21 days. Only residents becoming subordinates showed a marked effect of stress on immune parameters, while residents becoming dominant or intruders of both status were not affected. According to the authors, resident subordinates perceived the event more negatively and had a stronger immune impact than the others because they were the only animals that loosed the territory ownership. The situation is comparable in the social disruption stress: all the animals undergo threats and bits from the intruder, but dominants also lose their hierarchical status.

In a conclusion, the rank assessed in the food competition test is an individual characteristic that can influence the immune impact of social defeat. The stress was stronger in dominant mice, probably because they perceived the defeat differently from lower ranking mice and chose a different behavioral strategy in front of the intruder. The higher proliferation of splenocytes and the CS-resistance observed in dominants may be related to the presence of

wounds. This hypothesis is in agreement with the data of de Groot et al. (2002) who showed that an impairment of immunity after social stress occurs only in wounded mice.

4.3. Influence of social rank during a BCG infection

Usually, dominant mice were found to be more resistant than subordinates to viral (Ebbesen et al., 1991), tumoral (Grimm et al., 1996) and parasitic (Schuster and Schaub., 2001) challenges. The same results have been reported in other species like pig (Hessing et al., 1994) or cynomolgus monkeys (Cohen et al., 2003). All of these challenges necessitate a Th1 immune response. On the contrary, when a Th2 response is required, for example during an infection by the parasite *Babesia microti,* subordinate mice have lower parasitic load than dominants (Barnard et al., 1993; Smith et al., 1996). To test the hypothesis that social dominance is associated with a Th1 profile, mice were infected with BCG, which requires a Th1 response. We studied the production of two important cytokines in the response to BCG. IFN-γ is one of the major Th1 cytokines of the anti-BCG response. Non-infected macrophages and T lymphocytes produce IFN-γ that activates infected macrophages allowing them to kill the bacteria. IL-10 is a Th2 cytokine, which inhibits Th1 response and macrophage activation in mycobacterium-infected subjects (Orme et al., 1993; Murray and Young., 1999; Flynn and Chan., 2001). We showed that on day 21, when specific immunity against BCG is still developing, dominant mice produced more IFN-γ than mice from the other ranks in response to tuberculin, but also more Il-10. Finally dominants did not show a shift toward a Th1 profile in comparison to subordinates. This result is in accordance with the lack of a lower bacterial load in dominants. On day 94, there was only a small difference in IL-10 production between subordinates and dominants, and their production of IFN-γ was the same. It is hence possible that differences between ranks at day 21 were due to differences in the time course of acquisition of specific immunity against BCG. During the acute phase of infection, dominants could develop a specific response more rapidly than subordinates, but when infection becomes chronic, the differences between ranks would disappear.

CONCLUSION

The results of the present study show that social rank is related to behavioral, immune and endocrine differences in inbred balb/c mice. Social rank was linked with corticosterone status in basal conditions, but the occurrence of stress smoothed out rank differences. Under social

stress, rank had a predictive value for the intensity of skin injuries and the enhancement of splenocyte proliferation. The influence of social rank can be extended to non-social challenges, as production of cytokine against BCG was different in dominants and in subordinates. However, immune differences between ranks did not result in affectation of the time course of the infection. These results indicate that a part of the non-genetically determined individual differences in social but also in non-social challenges are associated with different social rank.

Acknowledgement

The authors thank Dr. Arnaud Aubert for his critical review of the manuscript. This study was supported by INSERM, INRA and DGA (agreement n°00.060.00.470.75.01).

REFERENCE LIST

Aubert, A., 2001. Emotionality, cognition, and social status in house mice. Advances in Ethology 36, 117

Avitsur, R., Stark, J.L., Dhabhar, F.S., Padgett, D.A. and Sheridan, J.F., 2002a. Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. J Neuroimmunol. 124, 54-61.

Avitsur, R., Stark, J.L., Dhabhar, F.S. and Sheridan, J.F., 2002b. Social stress alters splenocyte phenotype and function. J. Neuroimmunol. 132, 66-71.

Avitsur, R., Stark, J.L. and Sheridan, J.F., 2001. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. Horm. Behav. 39, 247-257.

Barnard, C.J., Behnke, J.M. and Sewell, J., 1993. Social behaviour, stress and susceptibility to infection in house mice (*Mus musculus*): effects of duration of grouping and aggressive behaviour prior to infection on susceptibility to *Babesi Microti*. Parasitology 108, 487-496.

Barnard, C.J., Behnke, J.M. and Sewell, J., 1996. Social status and resistance to disease in house mice (*Mus musculus*): status-related modulation of hormonal responses in relation to immunity costs in different social and physical environments. Ethology 102, 63-84.

Barnard, C.J. and Luo, N., 2002. Acquisition of dominance status affects maze learning in mice. Behav. Processes. 60, 53-59.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A.E., Ceresini, G., Poli, M.D. and Parmigiani, S., 2001. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependant. Physiol. Behav. 73, 401-410.

Benton, D., Dalymple-Alford, J.C. and Brain, P.F., 1980. Comparisons of measures of dominance in the laboratory mouse. Anim. Behav. 28, 1274-1279.

Benus, R.F., Bohus, B., Koolhaas, J.M. and van Oortmerssen, G.A., 1991. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. Experientia 47, 1008-1019.

Blanchard, R.J., Hori, K., Tom, P. and Blanchard, D.C., 1988. Social dominance and individual aggressiveness. Aggr. Behav. 14, 195-203.

Bohus, B., Koolhaas, J.M., Heijnen, C.J. and de Boer, O., 1993. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping habilities. Neuropsychobiology 28, 95-99.

Cohen, S., Line, S., Manuck, S.B., Rabin, B.S., Heise, E.R. and Kaplan, J.R., 2003. Chronic social stress, social status, and susceptibility to upper respiratory infections in nonhuman primates. Psychosom. Med. 59, 213-221.

de Groot, J., Boersma, W.J.A., Scholten, J.W. and Koolhaas, J.M., 2002. Social stress in male mice impairs long-term antiviral immunity selectively in wounded subjects. Physiol. Behav. 75, 277-285.

de Jong, I.C., Sgoifo, A., Lambooij, E., Korte, S.M., Blokhuis, H.J. and Koolhaas, J.M., 2001. Effects of social stress on heart and heart rate variability in growing pigs. Can. J. Anim. Sci. 80, 273-280.

Drews, C., 1993. The concept of dominance and definition of dominance in animal behaviour. Behaviour 125, 283-313.

Ebbesen, P., Villadsen, J.A., Villadsen, H.D. and Heller, K.E., 1991. Effect of subordinance, lack of social hierarchy, and restricted feeding on murine survival and virus leukemia. Exp. Gerontol. 26, 479-486.

Ely, D.L. and Henry, J.P., 1978. Neuroendocrine response patterns in dominant and subordinate mice. Horm. Behav. 10, 156-169.

Fano, E., Sánchez-MartÍn, J.R., Arregi, A., Castro, B., Alonso, A., Brain, P. and Azpíroz, A., 2001. Social stress paradigms in male mice: variations in behavior, stress and immunology. Physiol. Behav. 73, 165-173.

Flynn, JA.L. and Chan, J., 2001. Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol, 19: 93-129.

Fokkema, D.S., Koolhaas, J.M. and Van der Gugten, J., 1995. Individual characteristics of behavior, blood pressure, and adrenal hormones in colony rats. Physiol. Behav. 57, 857-862.

Fokkema, D.S., Smith, R.S., Van der Gugten, J. and Koolhaas, J.M., 1988. A coherent pattern among social behavior, blood pressure, corticosterone and catecholamine measures in individual male rats. Physiol. Behav. 42, 485-489.

Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Miailhe, A.-C. and Turcotte, R., 1981. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of Mycobacterium bovis BCG. Infect. Immun. 32, 42-47.

Fredericson, E., 1950. The effects of food deprivation upon competitive and spontaneous combat in C57 black mice. J. Psychol. 29, 89-100.

Geverink, N.A., Schouten, W.G.P., Gort, G. and Wiegant, V.M., 2002. Individual differences in behavioral and physiological responses to restraint stress in pigs. Physiol. Behav. 77; 451-457.

Grimm, M.S., Emerman, J.T. and Weinberg, J., 1996. Effects of social housing condition and behavior on growth of the Shionogi mouse mammary carcinoma. Physiol. Behav. 59, 633-642.

Gros, P., Skamene, E. and Forget, A., 1981. Genetic control of natural resistance to Mycobacterium bovis (BCG) in mice. J. Immunol. 127, 2417-2421.

Haemisch, A., Voss, T. and Gärtner, K., 1994. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. Physiol. Behav. 56, 1041-1048.

Hessing, M.J.C., Scheepens, C.J.M., Schouten, W.G.P., Tielen, M.J.M. and Wiepkema, P.R., 1994. Social rank and disease susceptibility in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 373-387.

Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., de Jong, I.C., Ruis, M.A.W. and Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. Neurosci. Biobehav. Rev. 23, 925-935.

Koyama, S. and Kamimura, S., 2000. Influence of social dominance and female odor on the sperm activity of male mice. Physiol. Behav. 71, 415-422.

Lee, Y.-P. and Craig, J.V., 1982. The social rank index as a measure of social status and its association with egg production in white leghorn pullets. Appl. Anim. Ethol. 8, 377-390.

Liège, S., Moze, E., Kelley, K.W., Parnet, P. and Neveu, P.J., 2000. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in IL-1β-converting enzyme-deficient mice. Neuroimmunomodulation 7, 189-194.

Lindzey, G., Winston, H. and Manosevitz, M., 1961. Social dominance in inbred mouse strains. Nature 191, 474-476.

Murray, P.J. and Young, R.A., 1999. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. Infect. Immun. 67, 3087-3095.

Neveu, P.J., 1996. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. Behav. Genet. 26, 373-377.

Orme, I.M., Andersen, P. and Boom, W.H., 1993. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* . J. Infect. Dis. 167, 1481-1497.

Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormède, P., Taghzouti, K., Simon, H. and Le Moal, M., 1986. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. Physiol. Behav. 36, 223-228.

Sacerdote, P., Manfredi, B., Gaspani, L. and Panerai, A.E., 2000. The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in BALB/cJ mice. Blood 95, 2031-2036.

Sachser, N. and Lick, C., 1989. Social stress in guinea pigs. Physiol. Behav. 46, 137-144.

Schuhr, B., 1987. Social structure and plasma corticosterone level in female albino mice. Physiol. Behav. 40, 689-693.

Schuster, J.P. and Schaub, G.A., 2001. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. Parasitol. Res. 87, 994-1000.

Segerstrom, S.C., Kemeny, M.E. and Laudenslager, M.L., 2001. Individual difference factors in psychoneuroimmunology. Ader R, Felten DL, et Cohen N. Psychoneuroimmunology 87-109.

Sheridan, J.F., Stark, J.L., Avitsur, R. and Padgett, D.A., 2000. Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. Ann. N. Y. Acad. Sci. 917, 894-904.

Smith, F.V., Barnard, C.J. and Behnke, J.M., 1996. Social odours, hormone modulation and resistance to disease in male laboratory mice, *Mus Musculus*. Anim. Behav. 52, 141-153.

Stark, J.L., Avitsur, R., Hunzeker, J., Padgett, D.A. and Sheridan, J.F., 2002. Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. J. Neuroimmunol. 124, 9-15.

Stark, J.L., Avitsur, R., Padgett, D.A., Campbell, K.A., Beck, F.M. and Sheridan, J.F., 2001. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 280, R1799-R1805

Stefanski, V., 1998. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. Physiol. Behav. 63, 605-613.

Stefanski, V. and Engler, H., 1999. Social stress, dominance and blood cellular immunity. J. Neuroimmunol. 94, 144-152.

Stowell, J.R., Kiecolt-Glaser, J.K. and Glaser, R., 2001. Perceived stress and cellular immunity: when coping counts. J. Behav. Med. 24, 323-339.

Van Loo, P.L.P., Mol, J.A., Koolhaas, J.M., Van Zutphen, B.F.M. and Baumans, V., 2001. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. Physiol. Behav. 72, 675-683.

Vekovishcheva, O.Yu., Sukhotina, I.A. and Zvartau, E.E., 2000. Co-housing in a stable hierarchical group is not aversive for dominant and subordinate individuals. Neurosci Behav. Physiol. 30, 195-200.

5ème chapitre : Importance des combats sur les conséquences immunitaires de la défaite sociale.

Objectifs : Les résultats du chapitre précédent suggèrent que les conséquences de la défaite sociale peuvent différer selon que l'animal occupe un statut de dominant ou de dominé dans son groupe avant le stress. En particulier, les dominants semblent être plus blessés. L'objectif de cette étude était donc de déterminer si les combats et les blessures sont un facteur déterminant dans les conséquences immunitaires de la défaite sociale. Pour cela, deux procédures de défaite sociale ont été utilisées, l'une induisant des combats et des blessures (groupe SDR), la seconde empêchant l'escalade des combats en séparant rapidement les animaux (groupe MSS).

Matériel et méthodes : La procédure de stress sans blessures est similaire à celle du SDR en terme de durée et de répétition. De la même façon, un nouveau mâle agressif est introduit pendant deux heures dans la cage des animaux résidents à chaque session de stress (jours 1 à 7). Cependant, dès que tous les résidents ont montré des postures de soumission face à l'intrus, celui-ci est déposé dans une petite cage incluse dans la cage des résidents. Cette séparation permet d'éviter les combats mais maintient un contact olfactif et visuel entre les résidents et l'agresseur jusqu'à la fin de la session. L'état de détérioration du pelage a été noté chaque jour dans chacun des trois groupes (SDR, MSS et témoin) afin de confirmer que le MSS induit peu de blessures. Les niveaux de corticostérone et d'IL-6 plasmatique immédiatement après la première (J1) et la dernière (J7) session de stress ont été comparés afin d'évaluer la réponse aiguë au stress. La production d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ par les splénocytes stimulé au LPS a été mesurée en présence de doses croissantes de corticostérone.

Résultats : La note de pelage, plus basse dans le groupe MSS que dans le groupe SDR, confirme que la procédure MSS empêche efficacement la survenue de blessures importantes (Fig.1 de l'article).

MSS et SDR induisent tous deux une augmentation similaire de la corticostérone plasmatique. L'augmentation de la corticostérone plasmatique en réponse à la défaite diminue entre la première et la dernière session de stress (Fig. 2 de l'article). Les deux procédures de stress induisent également une augmentation de l'IL-6 plasmatique au jour 1, les niveaux d'IL-6

étant quatre fois plus élevés dans le groupe SDR que dans le groupe MSS. Après la dernière session de stress, seul le groupe SDR présente encore une élévation significative d'IL-6 (Fig. 3 de l'article).

La capacité des splénocytes à produire de l'IL-6, de l'IL-10 et de l'IFN-γ ainsi que leur sensibilité aux glucocorticoïdes ne sont affectés que par le SDR (Fig. 4 de l'article). En accord avec les résultats des chapitres précédents, le SDR augmente la production d'IL-6 et diminue la sensibilité des splénocytes à la corticostérone.

Conclusion :

(1) L'augmentation comparable de la corticostérone dans les groupes MSS et SDR ne permet pas de mettre en évidence une différence d'intensité du stress « psychologique ». Cependant, l'augmentation plus importante d'IL-6 dans le groupe SDR suggère que les deux stress ne sont pas perçus de façon similaire par les animaux.

(2) L'absence d'effet du MSS sur les cultures de splénocytes met en évidence le fait que l'effet pro-inflammatoire de la défaite sociale apparaît quand celle-ci est associée à des combats. Ces différences entre un stress avec ou sans combats peuvent avoir deux causes : soit la présence de blessures et la forte activité physique induisent une plus forte activation neuroendocrinienne qui se répercute ensuite sur le système immunitaire, soit les blessures activent de façon directe le système immunitaire, générant ainsi les effets observés. Cette étude ne permet pas de déterminer l'importance relative de ces facteurs.

Þ Lors d'un stress social, l'apparition d'un état pro-inflammatoire dans la rate est induit par un stress induisant des combats et des blessures mais pas par un stress limitant ces derniers.

ELSEVIER

Physiology & Behavior 80 (2003) 351–357

PHYSIOLOGY & BEHAVIOR

Importance of fighting in the immune effects of social defeat

Elodie Merlot*, Elisabeth Moze, Robert Dantzer, Pierre J. Neveu

Neurobiologie Intégrative, INRA-INSERM, Institut François Magendie, Rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France

Received 12 May 2003; received in revised form 4 August 2003; accepted 21 August 2003

Abstract

Social defeat involves a clear physical component in the form of fight-induced injuries. The impact of body injuries on the immune response is not yet well known. In this study we compared the endocrine and immune responses to two types of social defeat in mice, one limiting the occurrence of skin injuries (mild social stress, MSS), and the other not (social disruption stress, SDR). In the two situations, six defeats were applied within 1 week. Plasma corticosterone and IL-6 levels were measured in blood samples taken after social defeat. Reactivity to LPS and sensitivity to corticosterone (CS) of spleen cells was assessed by measuring the in vitro production of cytokines (IL-6, IFN-γ and IL-10) in response to LPS under a range of increasing concentrations of CS. The two types of stressors induced a similar plasma corticosterone response, but SDR mice showed significantly higher plasma IL-6 than MSS mice. Splenocytes from SDR but not from MSS mice produced more IL-6 and IL-10 in response to LPS and presented an altered responsiveness to CS in comparison to control mice.

We conclude that the procedure involving fights and skin injuries was able to modulate the immune response in the spleen, whereas the procedure preventing the occurrence of fights did not. The increased immune reactivity observed in the fight-associated procedure could result from either a stronger psychological stress or a direct immune activation through the wounds.
© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Social defeat; Interleukin-6; Interleukin-10; Interferon-γ; Corticosterone resistance; Wounds; Mice

1. Introduction

Among the wide range of stress procedures commonly used in laboratory animals, many have little heuristic value because they are not related to the environmental challenges an animal can meet in its everyday life [1]. To answer this criticism, social stress has been extensively studied during the last years as a more naturalistic stressor [2–5]. Social stress can either enhance or suppress immune functions, depending on the stress procedure. Aggressive encounters were found to be associated with decreased splenocyte proliferation [6–8], natural killer cytotoxicity [9] and primary immunoglobulin response [10–12]. However, in other studies social stress did not affect these immune responses [11–13]. Social stress was even reported to enhance lymphocyte responsiveness [10]. The same contradicting results were found concerning the ability of immune cells to produce cytokines. Social defeat can suppress [7,14,15] or stimulate [16–18] cytokine production. Furthermore, social defeat can induce a state of resistance to the inhibitory action of glucocorticoids that favors the production of inflammatory cytokines [17,19,20]. This impairment of sensitivity to glucocorticoids leads to an excessive response of the immune system to inflammatory stimuli.

These contradicting results could be explained by the diversity of stress situations that have been used. First, the responses to a social challenge are highly dependent on the outcome of the interaction. The behavioral [7], endocrine [21] and immune [22,23] consequences of social interactions are usually stronger for the losers than for the winners. Among situations of social defeat, several procedures can be used, from a single exposure to defeat [14,24], to repeated social defeat [10,25], repeated defeat with maintained sensory contact [7,22], and long-term cohabitation [6]. All these procedures differ both in the nature and in the severity of stress [2]. They all involve a psychological component in the form of the loss of social control, but they differ in the duration and the frequency of the stress (acute, repeated or chronic). Social defeat also involves a clear physical component related to fight-induced injuries, which can be more or

* Corresponding author. Tel.: +33-5-57-57-37-10; fax: +33-5-56-98-90-29.

E-mail address: elodie.merlot@bordeaux.inserm.fr (E. Merlot).

0031-9384/$ – see front matter © 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.physbeh.2003.08.005

less important depending on the model of stress. However, the contribution of body injuries is not yet well known.

In the present experiments, we investigated the influence of skin injuries on the physiological response to social defeat in mice. For this purpose, we used two situations of repeated social defeat that were similar in terms of repetition and duration of the stress. In one situation, physical injuries were limited by rapidly separating the aggressor from defeated animals by a grid. In the second one, animals were not protected against fighting. Plasma levels of corticosterone and IL-6 were assessed since they are commonly used as measures of stress response. Reactivity of the innate system and its sensitivity to corticosterone inhibition were assessed by measuring the in vitro production of cytokines (IL-6, IFN-γ and IL-10) by splenic cells in response to LPS under a range of increasing concentrations of corticosterone.

2. Methods

2.1. Animals

Experimental animals were male BALB/c ByJ@Ico mice received from Charles River Laboratories (St Germain sur l'Arbresle, France). They were 5-week old at arrival, and were randomly assigned in groups of four, housed in a temperature-controlled room (24 ± 1 °C) with a 12-h light cycle (lights on 13:00–1:00 h). They were given free access to food and water, and were allowed to acclimate for 3 weeks before experiment. The mice used as aggressive intruders were 6-month old individually housed CD1 mice.

2.2. General procedures

Mice were randomly assigned to three different treatment groups labeled control (C, $n = 12$), social disruption stress (SDR, $n = 12$) or mild social stress (MSS, $n = 12$). SDR animals underwent six SDR sessions (3 days of stress, 1 day of rest, three additional days of stress) from Days 1 to 7 as previously described [17]. In each SDR session, a new older isolated aggressive male was introduced into the home cage of the four group-housed mice for 2 h (beginning between 13:00 and 14:00 h). Behavior was observed directly, and the intruder was replaced if he did not attack or if he was attacked by any of the residents. All residents showed submissive postures. MSS animals underwent 6 stress sessions at the same time and for the same duration as SDR animals. As in the SDR procedure, at each session, a new older isolated aggressive male was introduced into the home cage of the residents. Immediately after all residents had been attacked at least once and showed submissive postures (usually less than 5 min after the beginning of the procedure), the intruder was separated from residents by placing it into a small grid cage inside the home cage of the residents. This system allowed visual, olfactory and limited physical contact between animals but prevented fights. Control mice remained undisturbed in their home cage. The fur state of the three groups was scored before each stress session. Mice were weighed on Days −1, 4 and 7. Samples of approximately 50 μl of blood were collected from the retroorbital plexus for IL-6 and corticosterone assays. The first blood sampling occurred immediately after the first stress session (Day 1) and the second one immediately after the last session (Day 7). Blood samplings occurred between 15:00 and 16:00 h. Plasmas were frozen at −20 °C until analysis. Animals were sacrificed between 9:00 and 10:30, 18 h after the last stress session. Trunk blood was collected and spleens were removed for studying in vitro production of cytokines and corticosterone sensitivity of splenocytes. The protocol was approved by the local animal care committee.

2.3. Biological measures

An arbitrary index for fur condition derived from Barnard et al. [26] was used to evaluate the severity of injuries. Before each session, mice were attributed a score ranging from 1 to 4. A score of 1 (fur well groomed and polished) or 1.5 (fur not so well polished) was attributed to mice that did not show any skin injury. The next levels were attributed to mice presenting scars: score 2 = a small number of marks or bristling on the fur and score 3 = numerous marks. The level 4 corresponded to the presence of one or more visible wounds, where the fur was obviously disrupted. A global score, resulting from the average of the score for each stress session, was used for analysis.

Plasma corticosterone concentration was measured following ethanol extraction by a radiocompetitive binding assay using rhesus monkey transcortin, [^{3}H]corticosterone as the tracer, and dextran-coated charcoal as the adsorbent of free radioactivity [27]. Inter- and intraassay coefficients of variation were 14% and 7%, respectively.

Spleen cells responses to LPS and to corticosterone were assessed in vitro. Spleens were removed aseptically and dissociated in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Glasgow, UK). Addition of 2 ml of lysis buffer (0.28 M NH_4Cl, 0.02 M $KHCO_3$, 0.01 M EDTA) for 1 min eliminated red blood cells. After three washes, viable mononuclear cells were counted using trypan blue dye exclusion, and adjusted to 4.10^7 cells/ml in medium containing 5% of heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic antimycotic solution (Gibco). Cell suspensions (4.10^6 cell/well) were cultivated in 24-wells culture plates in a final volume of 1 ml in presence of 13 μg/ml of lipopolysaccharide (LPS, O127:B8 serotype, Sigma). The sensitivity of splenocytes to inhibition by corticosterone was tested by adding 0, 0.05, 0.1 or 1 μM of corticosterone (Sigma) per well. Corticosterone was diluted in ethanol at 0.01% final. Culture plates were incubated at 37 °C in 5% CO_2 atmosphere. After 72 h of incubation, cell

supernatants were harvested and frozen at −20 °C until cytokine analysis.

Interleukin -10 (IL-10), as an antiinflammatory cytokine, and interferon gamma (IFN-γ), as proinflammatory cytokine, were measured after adequate dilutions using sandwich ELISA sets from BD Pharmingen. As IL-6 was shown to be a good marker for assessment of corticosterone resistance [17], it was also measured in cell supernatants. For IFN-γ, intra- and interassay variability were 8% at 550 pg/ml. For IL-10, intra assay variability was 4% and inter assay variability was 5% at 500 pg/ml. For IL-6, intra assay variability was 5% and inter assay variability was 9% at 150 pg/ml.

2.4. Statistical analysis

Results were analyzed for the effect of the main factor (C, MSS or SDR) with a one-way ANOVA, except for plasma corticosterone levels of which the distribution did not follow a normal curve and were analyzed by Kruskal–Wallis analysis of variance. Cytokines data (IL-10, IFN-γ and IL-6) were analyzed after a $\log_{10}$ transformation to homogenize the variances. Plasma IL-6 and cytokine sensitivity to corticosterone were analyzed first with repeated measure ANOVA. As the effect of the repeated factor was significant (effect of day of sampling for plasma measures and effect of corticosterone dose for cytokine production), data were then analyzed separately for each factor level. The Tukey's test was used for post hoc analysis.

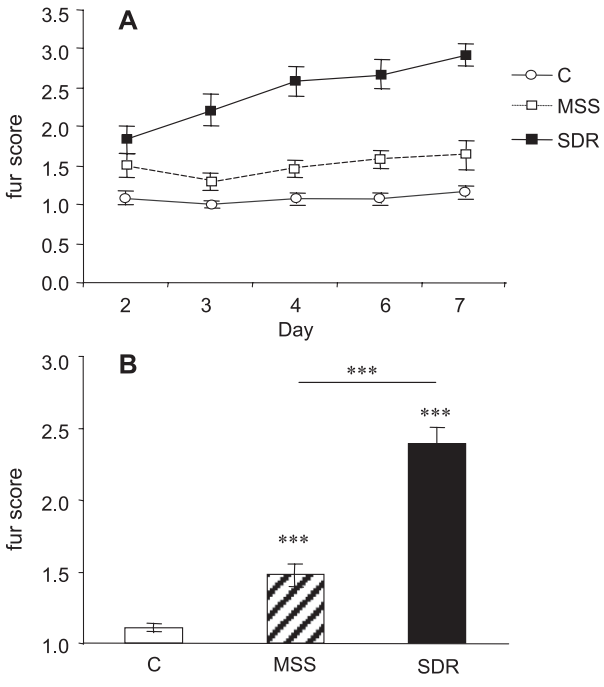


Fig. 1. Effect of stress on the state of fur. Data are presented as fur score means ± S.E.M. Fur score evolution from Day 2 (before the second stress session) to Day 7 (before the last stress session) (A) and global mean fur score for the all stress procedure (B) are presented. Stars above bars indicate groups significantly different from the control group. *** $P<.001$.

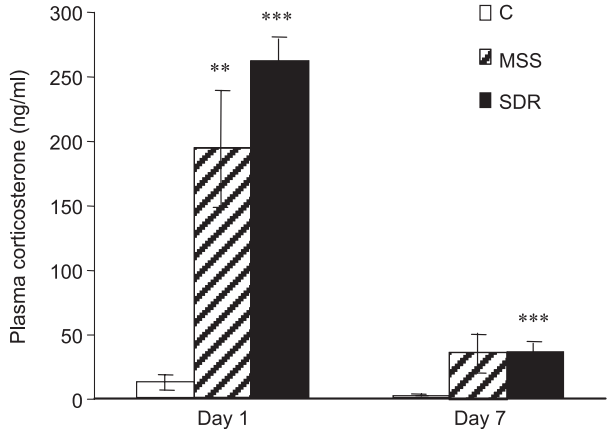


Fig. 2. Plasma corticosterone response just after the first (Day 1) and the last (Day 7) stress sessions. Data are presented as mean ± S.E.M. Stars above bars indicate groups significantly different from the control group. *** $P<.001$, ** $P<.01$.

3. Results

The lack of important skin injuries in the MSS group as compared to SDR group is illustrated in Fig. 1. Fur score was affected by treatment [$F(2,32)=89.3$, $P<.001$]. MSS mice had a fur score significantly higher than those in the control group ($P<.001$). However, the mean score of 1.5 reflects the fact that MSS animals never had a score higher than 2, and confirm that this stress procedure induced only scarce and superficial skin damages. The injuries were much more pronounced in the SDR group in comparison to MSS ($P<.001$) and C ($P<.001$) groups. The mean score of 2.4 reflects the fact that SDR animals underwent skin injuries

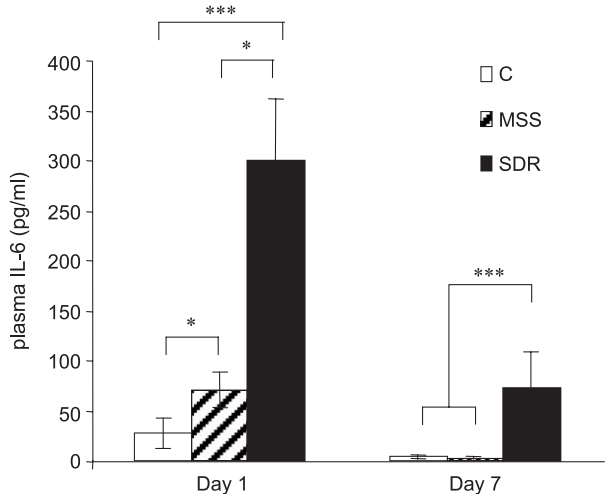


Fig. 3. Plasma IL-6 response just after the first (Day 1) and the last (Day 7) stress sessions. Data are presented as mean ± S.E.M. *** $P<.001$, ** $P<.01$, * $P<.05$.

several times during the repeated stress sessions (scores higher than 2). However, MSS and SDR did not affect the weight of the animals neither on Day 4 [$F(2,33)=0.66$, $P=.52$] nor on Day 7 [$F(2,33)=0.06$, $P=.94$].

Plasma levels of corticosterone (CS) were determined just after the first (Day 1) and the last (Day 7) stress sessions (Fig. 2). After the first session, CS levels were affected by treatment [$H(2,36)=18.0$, $P<.001$]. Both MSS ($P<.01$) and SDR ($P<.001$) mice showed increased CS levels in comparison to control group. The amplitude of the CS response was similar in the two stressed groups. CS levels were still affected after the sixth stress session [$H(2,35)=16.0$, $P<.001$], but to a lesser extent than on Day 1 ($P<.001$). CS levels were increased in SDR group in comparison to control group ($P<.001$). MSS levels were not statistically different from C and SDR groups. According to CS levels observed after the last stress session, animals of the MSS group could be divided into nonresponders (2 ± 1 ng/ml, $n=6$) and responders (76 ± 20 ng/ml, $n=6$). In nonresponders (NR), CS levels were similar to those of controls but lower as compared to responders (R) and SDR mice ($P<.001$). In responders, CS levels were similar to those of SDR mice. Nonresponders and responders also differed according to fur score (NR median: 1.3, R median: 1.5, $P<.01$). However, CS levels were similar in responders and nonresponders after the first stress session.

Treatments modified circulating levels of IL-6 [$F(2,33)=51.2$, $P<.001$, Fig. 3]. After the first stress session, MSS ($P<.05$) and SDR ($P<.001$) mice showed increased IL-6 levels in comparison to control. The increase of IL-6 was higher in the SDR group than in the MSS group ($P<.05$). After the sixth stress session, only SDR mice still showed an IL-6 response to stress ($P<.001$). MSS mice had the same IL-6 level as control mice. The increase in IL-6 was less

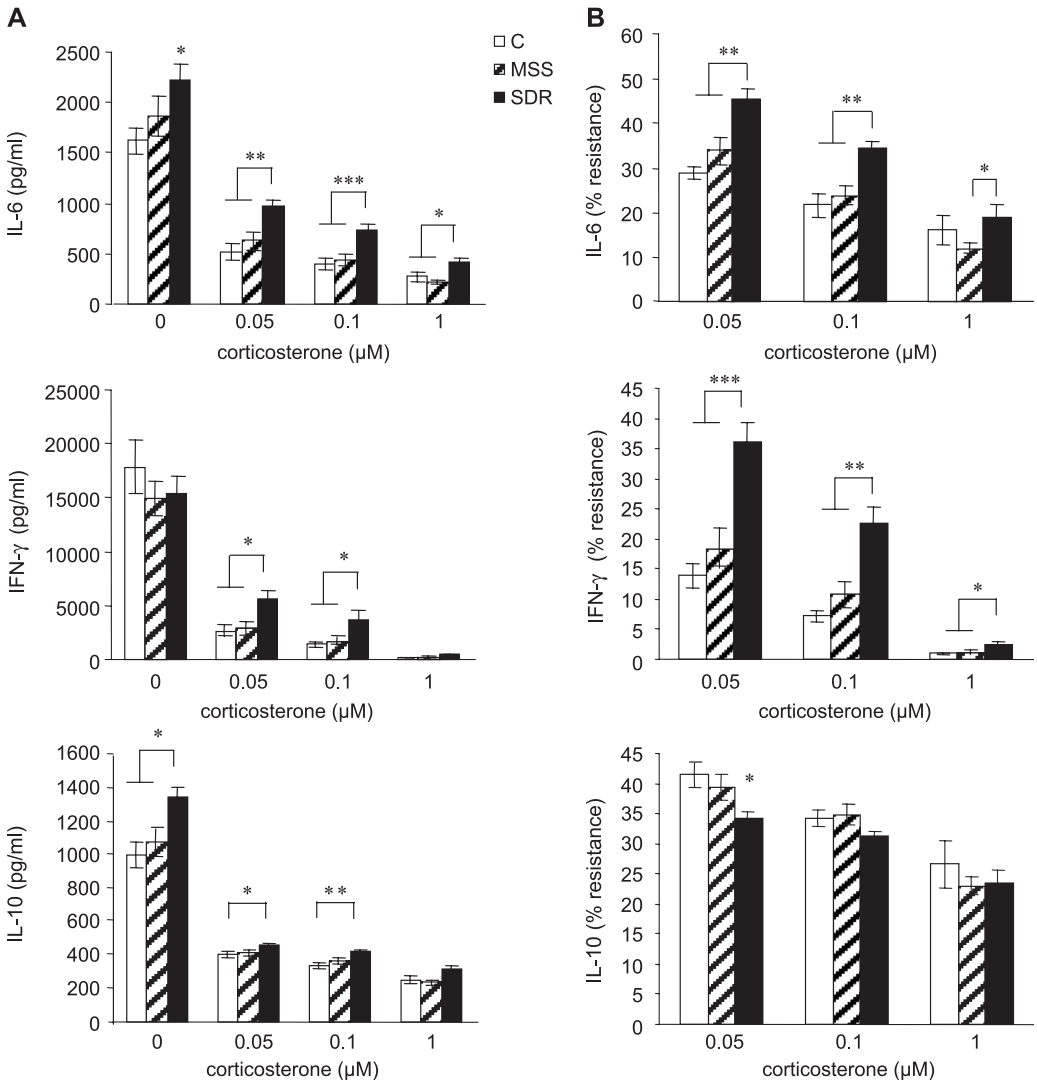


Fig. 4. Effect of MSS and SDR on the development of corticosterone resistance. Altered sensitivity of splenocytes to corticosterone inhibition was assessed by measuring in vitro IL-6, IFN-γ and IL-10 production in response to LPS in the presence of increasing doses of corticosterone. Data are expressed in pg/ml as mean ± S.E.M. (A) and in percent of the production at 0 μM of corticosterone ± S.E.M. (B). *** $P<.001$, ** $P<.01$, * $P<.05$.

pronounced on the last day than on the first one in the SDR group ($P<.01$) and totally suppressed in the MSS group ($P<.001$). Plasma IL-6 was undetectable in the three groups on Day 8.

To assess whether splenic cells from the two groups of stressed animals showed impaired responsiveness to LPS, cells from control, MSS and SDR animals were cultured with LPS. Supernatants were assayed for their cytokine content. After LPS stimulation without corticosterone (Fig. 4A), IL-6 production was influenced by stress procedures [$F(2,30)=13.9$, $P<.001$]. Splenocytes from SDR mice produced 37% more IL-6 than C mice ($P<.05$). Levels of MSS mice were intermediate and did not differ neither from C nor from SDR mice. IL-10 production was also influenced by stress [$F(2,31)=8.2$, $P<.01$]. Splenocytes from SDR mice produced more IL-10 than C mice ($P<.01$) and MSS mice ($P<.05$). IL-10 levels in MSS group did not differ from C group. IFN-γ production did not differ between C, SDR and MSS groups [$F(2,31)=0.53$, $P=.59$].

To test whether splenic cells from the two groups of stressed animals showed impaired responsiveness to corticosterone, cells were cultured with LPS and increasing concentrations of corticosterone (Fig. 4A). Addition of corticosterone decreased IL-6 production in a dose-dependant fashion in the three groups of mice [$F(3,90)=499$, $P<.001$]. Splenocytes from SDR mice produced more IL-6 in comparison to control when cultured at 0.05 μM ($P<.01$), 0.1 μM ($P<.001$) and 1 μM ($P<.05$) of corticosterone. Splenocytes from MSS mice did not differ from control. The resistance of splenocytes to the inhibiting effect of corticosterone can be expressed as the percent of cytokine production in corticosterone-treated cultures compared with untreated cultures (Fig. 4B). At concentrations of 0.05 and 0.1 μM, cells from SDR mice showed a lower sensitivity to corticosterone than C and MSS cells ($P<.01$). For IFN-γ production, a very similar pattern was observed: the inhibitory effect of CS on IFN-γ production was less pronounced in splenocytes from SDR than from C group at 0.05 μM ($P<.05$) and 0.1 μM ($P<.05$) of corticosterone. Splenocytes from MSS mice had a similar responsiveness as controls. When results were expressed as the percentage of inhibition, cells from SDR mice appeared to be less sensitive to CS than those from C and MSS mice at concentrations of 0.05 μM ($P<.001$), 0.1 μM ($P<.01$) and 1 μM ($P<.05$). To test if the resistance to corticosterone was only specific to inflammatory cytokines, supernatant IL-10 contents were measured. Corticosterone decreased IL-10 production in the three groups of mice [$F(3,93)=649$, $P<.001$]. Splenocytes from SDR mice produced more IL-10 in comparison to control when cultured at 0.05 μM ($P<.05$), 0.1 μM ($P<.01$) and 1 μM ($P=.09$) of corticosterone. Splenocytes from MSS mice did not differ from control. Expression of the results in percent of production in untreated cultures shows that IL-10 production was not resistant to corticosterone inhibition in SDR group.

4. Discussion

The aim of this study was to compare the responses to two types of social defeat, one limiting the occurrence of skin injuries (MSS), and the other not (SDR). The two procedures induced different endocrine and immune responses. After the first stress session, MSS mice had a similar plasma corticosterone but a lower plasma IL-6 response than SDR mice. After the sixth stress session, MSS mice did not show any plasma IL-6 increase, while SDR group still did. Splenocytes from SDR mice produced more IL-6 and IL-10 in response to LPS and presented a lower sensitivity to CS, while splenocytes from MSS mice did not differ from those of C mice for the same variables.

SDR is a clearly inescapable stress, where animals cannot avoid the aggression by the intruder. On the contrary, in the MSS situation, animals can avoid aggressive interactions by staying far away from the intruder enclosure. The higher score of fur deterioration in SDR in comparison to MSS group indicates that the severity of fights was stronger in the SDR group. Nevertheless, MSS and SDR induced similar CS responses on Day 1. The reduction in CS response on Day 7 compared to Day 1 in both groups indicates that mice habituated to both stressors. However, in the MSS group, half of the animals showed CS levels similar to controls after the sixth stress session whereas in the other half, levels were similar to those of the SDR group. The occurrence of bites may have increased the emotional response to stress, and slowed the process of habituation. Indeed MSS mice that still showed increased CS levels on Day 7 had higher deterioration fur score than nonresponders. However, the amplitude of the CS increase is not proportional to the severity of injuries, since the CS increase was similar in responders to MSS and in SDR mice.

MSS and SDR groups could be easily distinguished according to their plasma IL-6 levels. Plasma IL-6 responses were higher in SDR mice than in MSS mice on Days 1 and 7. This finding could point toward a role for skin injuries in plasma IL-6 induction. However, several arguments suggest that IL-6 was not due to a wound-associated inflammation but was a part of the acute response to the psychological stress of defeat. First, plasma IL-6 rose immediately after the first stress session. At this time, injuries induced by SDR were very rare and it is unlikely that they could have induced an inflammatory response measurable at a systemic level so rapidly. Secondly, as the fur state dramatically deteriorated between the first and the last SDR session, plasma IL-6 concentrations should have been higher on Day 6 than on Day 1.

Augmentation of plasma IL-6 levels can be observed after open-field stress [28], restraint [29–35] or conditioned aversive stress [30]. This response is quite similar to those of corticosterone in terms of kinetics but it is observed only for a stronger stimulus [30]. The plasma IL-6 response increases with the intensity [30] and duration [28,34] of the stressor. The mechanisms of induction of plasma IL-6 after psycho-

logical stress still remain to be clarified. IL-6 does not seem to have an immune origin: there is no correlation of plasma IL-6 levels with IL-6 mRNA levels in the spleen [31] or in vitro IL-6 production by peripheral blood leukocytes or splenocytes [30]. It has been proposed that the liver or adrenals were the main sources of stress-induced IL-6 [30], but endothelial, muscular and adipose cells can also release significant amounts of IL-6 in the blood [31–34,36–39]. In any case, the increase in plasma IL-6 seem to result from sympathetic activation [32,36,37]. Though, the higher levels of plasma IL-6 in SDR in comparison to MSS group could be due to a higher sympathetic activity, resulting from a stronger emotional response to stress or a stronger fight-induced physical activity in SDR group.

In vitro cytokine production by lymphocytes is usually inhibited by stressors such as restraint [40–43] or mild foot shocks [44], whereas cytokine production by cells from the innate system is stimulated [45]. Similarly, during situations of social stress, the cytokine production by splenic cells is decreased in response to T-cell mitogens [7] and increased in response to LPS [14–18]. In the present study, SDR also increased in vitro cytokine production in response to LPS [46] but MSS did not. These differences in cytokine production between MSS and SDR can be explained by differences in the level of psychological stress and the severity of skin injuries. However, in the present study, CS responses were quite similar in SDR and MSS mice, and only plasma IL-6 allowed to suspect that the neuroendocrine activation, and probably the psychological stress, were stronger in the SDR procedure. Wounds have been shown to contribute to the modulation of cytokine production by T-cells during social stress [15]. In the case of a stress associated with severe wounds, the classical activation of the sympathetic system and the hypothalamo–hypophyso–adrenal axis could be associated with a direct activation of the immune system by the injuries. Pretreatment with very low doses of pathogen associated molecular patterns such as LPS have been shown to enhance subsequent in vitro proinflammatory cytokine production by mouse macrophages [47]. This could be one possible explanatory mechanism for what is observed in wounded socially stressed animals. Indeed some microbial agents, entering the body at the level of wounds, may reach the spleen via blood circulation and sensitize splenic cells to a subsequent LPS stimulation.

Resistance to corticosterone was observed for the production of IL-6 and IFN-γ production but not of IL-10, suggesting that the effect of corticosterone resistance was specific to inflammatory cytokines. It has been shown that corticosterone resistance developed only among subjects that were wounded during SDR [48]. In the present experiment, it was not possible to dissociate two categories of individuals according to their wound status because all SDR mice were wounded. However, the fact that SDR but not MSS induced corticosterone resistance reinforce the hypothesis that skin injuries are involved in CS resistance either by increasing the emotional response or by directly activating immune cells through the wounds. Other studies in rodents showed that resistance of immune cells to the suppressive effect of glucocorticoids can be observed after both escapable and inescapable foot shocks [20], fights among conspecifics [19,48,49] but not after noise stress [50] or restraint [51]. This suggests that the appearance of resistance to glucocorticoids is linked with somatic blows that can induce a local or systemic inflammatory response.

In this study, two procedures of social defeat led to different consequences on the immune system, showing that immune consequences of a procedure of social defeat cannot be easily extrapolated. There seem to be a qualitative shift between situations involving or not direct fights. The procedure involving fights and skin injuries was able to stimulate cytokine production by splenic cells and to induce resistance to corticosterone in these cells, whereas the procedure preventing fights did not. The increased immune reactivity observed in the fight-associated procedure could result from either a stronger psychological stress or a direct immune activation through the wounds.

Acknowledgements

This study was supported by INSERM, INRA and DGA (Agreement No. 00.060.00.470.75.01).

References

[1] Koolhaas JM, De Boer SF, de Ruiter AJH, Meerlo P, Sgoifo A. Social stress in rats and mice. Acta Physiol Scand 1997;640:69–72.
[2] Zelena D, Haller J, Halász J, Makara GB. Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. Brain Res Bull 1999;48:297–302.
[3] Van kampen M, Kramer M, Hiemke C, Flügge G, Fuchs E. The chronic psychosocial stress paradigm in male tree shrews: evaluation of a novel animal model for depressive disorders. Stress 2002;5:37–46.
[4] Sgoifo A, Koolhaas JM, De Boer SF, Musso E, Stilli D, Buwalda B, et al. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. Neurosci Biobehav Rev 1999;23:915–23.
[5] Keeney AJ, Hogg S. Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. Behav Pharmacol 1999;10:753–64.
[6] Stefanski V, Knopf G, Schulz S. Long-term colony housing in Long–Evans rats: immunological, hormonal, and behavioral consequences. J Neuroimmunol 2001;114:122–30.
[7] Bartolomucci A, Palanza P, Gaspani L, Limiroli E, Panerai AE, Ceresini G, et al. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependant. Physiol Behav 2001;73:401–10.
[8] Raab A, Dantzer R, Michaud B, Mormède P, Taghzouti K, Simon H, et al. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident–intruder dyads of male rats. Physiol Behav 1986;36:223–8.
[9] Stefanski V. Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis. Physiol Behav 2001;73:385–91.
[10] Bohus B, Koolhaas JM, Heijnen CJ, de Boer O. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. Neuropsychobiology 1993;28:95–9.
[11] Lyte M, Nelson SG, Baissa B. Examination of the neuroendocrine

basis for the social conflict-induced enhancement of immunity in mice. Physiol Behav 1990;48:685–91.
[12] Lyte M, Nelson SG, Thompson ML. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. Clin Immunol Immunopathol 1990;57:137–47.
[13] Klein F, Lemaire V, Sandi C, Vitiello S, Van der Logt J, Laurent PE, et al. Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. Life Sci 1992;50:723–31.
[14] de Groot J, van Milligen FJ, Moonen-Leusen GT, Thomas G, Koolhaas JM. A single social defeat transiently suppresses the anti-viral immune response in mice. J Neuroimmunol 1999;95:143–51.
[15] de Groot J, Boersma WJA, Scholten JW, Koolhaas JM. Social stress in male mice impairs long-term antiviral immunity selectively in wounded subjects. Physiol Behav 2002;75:277–85.
[16] Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Stark M, Watkins LR, Maier SF. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. Brain Behav Immun 2002;16:461–76.
[17] Stark JL, Avitsur R, Padgett DA, Campbell KA, Beck FM, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001;280:R1799–805.
[18] Quan N, Avitsur R, Stark JL, He L, Shah M, Caligiuri M, et al. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. J Neuroimmunol 2001;115:36–45.
[19] Avitsur R, Stark JL, Dhabhar FS, Padgett DA, Sheridan JF. Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. J Neuroimmunol 2002;124:54–61.
[20] O'Connor KA, Johnson JD, Hammack SE, Brooks LM, Spencer RL, Watkins LR, et al. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. Psychoneuroendocrinology 2003;28:481–500.
[21] Stefanski V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. Psychoneuroendocrinology 2000;25:389–406.
[22] Stefanski V, Engler H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. J Neuroimmunol 1999;94:144–52.
[23] Fauman MA. The relation of dominant and submissive behavior to the humoral immune response in balb/c mice. Biol Psychiatry 1987;22:771–6.
[24] Meerlo P, Overkamp GJF, Daan S, Van den hoofdakker RH, Koolhaas JM. Changes in behaviour and body weight following a single or double social defeat in rats. Stress 1996;1:21–32.
[25] Keeney AJ, Hogg S, Marsden CA. Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. Physiol Behav 2001;74:177–84.
[26] Barnard CJ, Behnke JM, Sewell J. Social status and resistance to disease in house mice (*Mus musculus*): status-related modulation of hormonal responses in relation to immunity costs in different social and physical environments. Ethology 1996;102:63–84.
[27] Liège S, Moze E, Kelley KW, Parnet P, Neveu PJ. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis in IL-1β-converting enzyme-deficient mice. Neuroimmunomodulation 2000;7:189–94.
[28] LeMay LG, Vander AJ, Kluger MJ. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. Physiol Behav 1990;47:957–61.
[29] Nukina H, Sudo N, Komaki G, Yu X-N, Mine K, Kubo C. The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha level. Neuroimmunomodulation 1998;5:323–7.
[30] Zhou D, Kusnecov AW, Shurin MR, DePaoli M, Rabin BS. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin - 6: relationship to the activation of hypothalamic–pituitary–adrenal axis. Endocrinology 1993;133:2523–30.
[31] Nukina H, Sudo N, Aiba Y, Oyama N, Koga Y, Kubo C. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. J Neuroimmunol 2001;115:46–52.
[32] Takaki A, Huang Q-H, Arimura A. Is immobilization-induced plasma IL-6 elevation regulated by hepatic innervation? In: Shimazu T, editor. Liver innervation, and the neural control of hepatic function. London: John Libbey; 1996. p. 221–6.
[33] Kitamura H, Konno A, Morimatsu M, Jung BD, Kimura K, Saito M. Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. Biochem Biophys Res Commun 1997;238:707–11.
[34] Takaki A, Huang Q-H, Somogyvari-Vigh A, Arimura A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. Neuroimmunomodulation 1994;1:335–42.
[35] Merlot E, Moze E, Dantzer R, Neveu PJ. Suppression of restraint-induced plasma cytokines in mice pretreated with LPS. Stress 2002;5:131–5.
[36] Mohamed-Ali V, Flower L, Sethi J, Hotamisligil G, Gray R, Humphries SE, et al. beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:5864–9.
[37] Gornikiewicz A, Sautner T, Brostjan C, Schmierer B, Függer R, Roth E, et al. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. FASEB J 2000;14:1093–100.
[38] Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. FASEB J 2002;16:1335–47.
[39] Frost RA, Nystrom GJ, Lang CH. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002;283:R698–709.
[40] Dobbs C, Feng N, Beck FM, Sheridan JF. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. J Immunol 1996;157:1872–7.
[41] Zhang D, Kishihara K, Wang B, Mizobe K, Kubo C, Nomoto K. Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of Listeria monocytogenes. J Neuroimmunol 1998;92:139–51.
[42] Brown DH, Zwilling BS. Activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. J Neuroimmunol 1994;53:181–7.
[43] Iwakabe K, Shimada M, Ohta A, Yahata T, Ohmi Y, Habu S, et al. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. Immunol Lett 1998;62:39–43.
[44] Sonnenfeld G, Cunnick JE, Armfield A, Wood PG, Rabin BS. Stress-induced alterations in interferon production and class II histocompatibility antigen expression. Brain Behav Immun 1992;6:170–8.
[45] Zhu GF, Chancellor-Freeland C, Berman AS, Kage R, Leeman SE, Beller DI, et al. Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. J Neurosci 1996;16:3745–52.
[46] Stark JL, Avitsur R, Hunzeker J, Padgett DA, Sheridan JF. Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. J Neuroimmunol 2002;124:9–15.
[47] Hirohashi N, Morrison D. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. Infect Immun 1996;64:1011–5.
[48] Avitsur R, Stark JL, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. Horm Behav 2001;39:247–57.
[49] Buwalda B, De Boer SF, Schmidt ED, Felszeghy K, Nyakas C, Sgoifo A, et al. Long-lasting deficient dexamethasone suppression of hypothalamic–pituitary–adrenocortical activation following peripheral CRF challenge in socially defeated rats. J Neuroendocrinol 1999;11:513–20.
[50] Sandi C, Cambronero JC, Borrell J, Guaza C. Effects of HPA hormones on adapted lymphocyte responsiveness to repeated stress. Brain Res Bull 1992;28:581–5.
[51] Sheridan JF, Stark JL, Avitsur R, Padgett DA. Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. Ann N Y Acad Sci 2000;917:894–904.

6ème chapitre : Effet d'un prétraitement par le LPS sur les réponses endocriniennes et immunes à un stress de contention.

Objectifs : Les résultats présentés au chapitre 2, ainsi que ceux de la littérature laissaient penser que le SDR est capable de modifier le fonctionnement du système immunitaire en réponse à une infection par le BCG. Au chapitre 3, le SDR a été appliqué à des animaux infectés depuis 11 jours, dont le système immunitaire était déjà activé pour faire face à l'infection. Les résultats montrent que le SDR n'affecte pas la résistance à la bactérie. Cette absence d'effet peut être due au fait que l'activation préalable du système immunitaire par le BCG a diminué la sensibilité des cellules immunitaires au stress.

Afin de tester l'hypothèse selon laquelle une activation préalable du système immunitaire réduit sa sensibilité à un stress ultérieur, nous avons utilisé un protocole expérimental plus simple. L'interaction entre un stimulus inflammatoire (une injection de LPS) et un stimulus psychologique ultérieur (un stress de contention) a été étudiée.

Matériel et méthodes : Des souris ont reçu une injection de LPS ou de solution saline (C) par voie intra péritonéale. Une semaine après, un stress de contention de 4 heures a été appliqué à une moitié des animaux (groupes C-R et LPS-R), tandis que l'autre moitié n'a pas été manipulée (groupes C-C et LPS-C). Les animaux ont été sacrifiés immédiatement après la fin de la contention. La réponse de l'axe corticotrope, la réactivité des splénocytes et la libération d'IL-6 et d'IL-1β plasmatiques ont été mesurées.

Résultats : Le stress de contention augmente les concentrations de corticostérone plasmatique (Fig.1 de l'article) de façon similaire dans les groupes C-R et LPS-R. La prolifération des lymphocytes est diminuée par le pré-traitement au LPS (groupes LPS-C et LPS-R) par rapport aux animaux non traités (groupes C-C et C-R), mais la contention n'affecte pas la prolifération lymphocytaire (Fig. 2 de l'article). La contention induit la libération d'IL-1 et d'IL-6 dans le plasma (Fig. 3 de l'article). Dans le groupe prétraité au LPS, l'augmentation d'IL-1 plasmatique est beaucoup plus faible que dans le groupe non injecté. Une tendance similaire est observée pour l'IL-6, bien que l'interaction entre le pré-traitement et le stress ne soit pas significative.

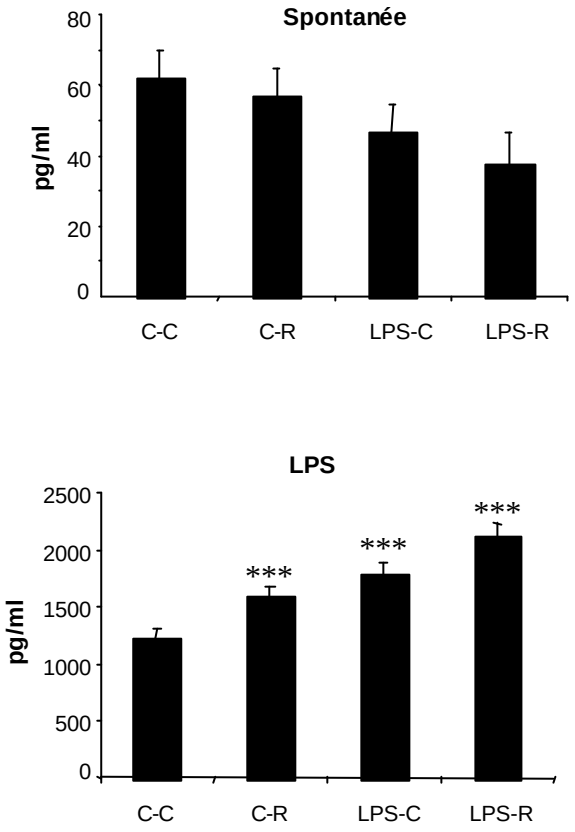


Figure 8: Production *in vitro* d'IL-6 par les splénocytes.

C-C : injection de solution saline et pas de contention; C-R : injection de solution saline et 4 heures de contention; LPS-C : injection de LPS et pas de contention; LPS-R : injection de LPS et 4 heures de contention. Les animaux ont été sacrifiés immédiatement après les 4 heures de contention ou de traitement témoin. Les splénocytes ont été mis en culture sans ajout de mitogène ou en présence de LPS (13 µg/ml). Le surnageant de culture a été prélevé au bout de 4 jours d'incubation et les concentrations d'IL-6 dosées par ELISA (Pharmingen). *** différent du groupe C-C avec $P<0.001$.

Discussion et conclusion :

(1) L'injection d'une dose faible de LPS altère la réactivité des splénocytes à long terme puisque leur prolifération en réponse à un mitogène est encore diminuée par le LPS une semaine après l'injection.

(2) Le pré-traitement au LPS s'oppose à l'augmentation d'IL-1 plasmatique induite par la contention. Ceci montre qu'une composante de la réponse inflammatoire induite par un stress psychologique peut être partiellement inhibée par une stimulation immunitaire récente.

(3) Il ne semble pas que cette « désensibilisation » soit due à une diminution de la réponse de l'axe corticotrope puisque les réponses de la corticostérone et de l'ACTH à la contention sont similaires quel que soit le prétraitment. La diminution de la réactivité au stress est donc probablement due à une modification de la réactivité des cellules productrices de l'IL-1 plasmatique.

Données non publiées : La production d'IL-6 et d'IL-10 par les splénocytes a été mesurée dans les surnageants de culture non stimulés ou stimulés au LPS. Le prétraitement au LPS a tendance à diminuer la libération spontanée d'IL-6 ($P<0.1$) mais n'affecte pas celle d'IL-10 (Fig.8). La contention n'a pas d'effet sur la production spontanée de cytokines. En revanche, la contention et le prétraitement au LPS augmentent tous deux la production d'IL-6 dans les surnageants stimulés au LPS ($P<0.001$). La production d'IL-10 n'est affectée par aucun des deux facteurs.

Ces résultats montrent que la contention exerce un effet pro-inflammatoire sur les splénocytes en augmentant leur production d'IL-6 en réponse à une stimulation par le LPS. En revanche, ils confirment que le prétraitement au LPS n'a pas interagi avec le stress de contention au niveau des splénocytes.

Þ L'activation préalable du système immunitaire par un stimulus inflammatoire diminue la réponse inflammatoire à un stress psychologique ultérieur au niveau systémique mais pas dans la rate.

Stress, 2002 VOL. 5 (2), pp. 131–135

Taylor & Francis healthsciences

Suppression of Restraint-induced Plasma Cytokines in Mice Pretreated With LPS

E. MERLOT, E. MOZE, R. DANTZER and P.J. NEVEU*

INSERM U394, "Neurobiologie Intégrative", Institut François Magendie, rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux, France

(Received 28 May 2001; Revised 28 August 2001; In final form 21 September 2001)

A previous exposure to an inflammatory reaction is known to increase or decrease the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis induced by a psychological/physical stress. Beside HPA activation, the non- specific responses to these two kinds of stresses involve the immune system including the production of cytokines. Therefore, they could interfere in cytokine production. In order to test this hypothesis, female C3H mice were first injected i.p. with 5 μg of lipopolysaccharide (LPS) or not (C). Eight days later, half of them were submitted to a 4 h-restraint (R) applied during the nocturnal part of the dark–light cycle and sacrificed immediately after (groups LPS-R and C-R), while the non restrained mice stayed in their home cages (groups LPS-C and C-C). Restraint induced an increase in corticosterone production that was not altered by the previous administration of LPS. It had no effect on mitogen-induced lymphoproliferation. However, restraint induced an augmentation of plasma concentrations of interleukin (IL)-1 and IL-6 that was not observed in animals previously exposed to LPS. These results show that restraint, which represents a psychological stress is able to induce the production of plasma cytokines in mice. They also suggest that LPS may induce a long lasting suppression of plasma cytokines through mechanisms that remain to be elucidated.

Keywords: Lipopolysaccharide; Restraint; Desensitization; Interleukin-1β; Interleukin-6

INTRODUCTION

Physical/psychological and immune stressors induce similar non-specific responses which include the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis, the stimulation of the sympathetic nervous system, alterations of brain metabolism and immune modifications including the production of cytokines (for review see Besedovsky and Del Rey, 1996). Therefore, it may be hypothesized that non-specific responses to a stressor may alter the responses to a subsequent stressor of a different nature. Indeed, a prior immobilization was shown to decrease the production of ACTH induced by a second physical/psychological (Marti *et al.*, 1999) or inflammatory stress (Mekaouche *et al.*, 1994). Likewise, inflammation induced by an injection of IL-1 or LPS can increase or decrease the ACTH response to a subsequent stress or to a second injection of IL-1 or LPS (Weidenfeld and Yirmiya, 1996; Schmidt *et al.*, 1995; Nagano *et al.*, 1999). These seemingly contradictory data may result from the nature of the stressors used and from the time interval between stressors. Sensitization could be observed after a mild stress applied for a short period of time and when the interval of time between stressors is rather long. By contrast, desensitization could be observed after a strong stress and when the interval of time is short (Andrès *et al.*, 1999). The mechanisms involved in the phenomena of sensitization and desensitization were mainly studied at the level of HPA axis activity. Desensitization was found to be not directly related to the plasma concentration of corticosterone, but appeared to depend on a glucocorticoid status which remains to be defined (Marti *et al.*, 1999). By contrast, sensitization was observed only in the presence of a basal level of corticosterone, suggesting that mineralo-corticoid receptors may be involved (Andrès *et al.*, 1999). Sensitization induced by IL-1 was shown to be due to a long-lasting increase in production and storage of vasopressin in the hypothalamic CRH neurons (Schmidt *et al.*, 1995).

The phenomena of sensitization–desensitization also involve the production of cytokines. The production of IL-1 induced by LPS may be increased by a previous stress (Mekaouche *et al.*, 1994) or depressed by a pretreatment with LPS (Nagano *et al.*, 1999). However, the

*Corresponding author. Tel.: +33-5-57-57-37-10. Fax: +33-5-56-98-90-29. E-mail: pierre.neveu@bordeaux.inserm.fr

ISSN 1025-3890 print/ISSN 1067-8888 online © 2002 Taylor & Francis Ltd
DOI: 10.1080/10253890290027921

mechanisms involved in the regulation of the production of cytokines remain unknown.

In the present work, we determined the influence of a pretreatment with LPS on immune reactivity and especially on the production of cytokines in response to a restraint stress.

MATERIALS AND METHODS

Animals

Female mice of the C3H/OuJiCo strain (IFFA Credo, l'Arbresle, France) were used. They were 4 weeks old on arrival and were housed in groups of five in a temperature-controlled room (24 ± 1°C) with a 12 h dark–12 h light cycle (lights on 16.30–4.30 h). They were maintained on an *ad libitum* food and water regimen.

Treatments

As the corticoid stress response (Neveu and Moya, 1997) and the neurochemical, neuroendocrine and immune responses to LPS (Delrue *et al.*, 1994) depend on lateralization, the animals were tested for their paw preference before treatment. During a 3-week period, animals were tested for paw preference according to a method previously described (Betancur *et al.*, 1991). One week after behavioral tests, half of the mice were first injected intra-peritoneally with 5 µg of lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* (0127:B8, Sigma) dissolved in 0.5 ml of saline. Other mice did not receive any treatment (C). Eight days later, half of the mice were restrained (R). Restraint consisted of placing mice into a 50 ml aerated culture tube for 4 h at the end of the night, just before they were killed. Control mice were left in their home cage. Therefore, we used four experimental groups of 24 mice named: C-C, LPS-C, C-R, and LPS-R. In previous work (Li *et al.*, 2000), we had shown that restraint applied for a short period of time (1–2 h) during the inactive phase had no effect on plasma cytokines. We therefore used a longer duration of restraint and applied it during the active period instead of the inactive one in order to increase the potential immune effects of restraint. Mice were killed by decapitation and trunk blood was collected in EDTA-coated tubes. After centrifugation, plasma was stored at −20°C until assayed. The hypothalamus was rapidly removed from the brains and kept at −80°C until cytokine assay. Spleens were removed in sterile conditions to assess mitogen-induced lymphoproliferation.

Plasma Corticosterone

Plasma corticosterone concentration was measured following ethanol extraction by radiocompetitive binding assay using rhesus monkey transcortin, [^{3}H]corticosterone as the tracer, and dextran-coated charcoal as the adsorbent of free radioactivity (Liège *et al.*, 2000). Inter- and intra-assay coefficients of variation were 14 and 7%, respectively.

Lymphocyte Proliferation

Spleen cells were dissociated in RPMI 1640 culture medium (Gibco, Glasgow, UK) and after three washes adjusted to 2×10^6 cells/ml in medium containing 5% heat-inactivated fetal calf serum and 1% antibiotic antimycotic solution (Gibco). Triplicates of cell suspensions (2×10^5 cells/well) were cultivated in microtest-2 plates (Nunc, Roskilde, Denmark) for 4 days in a humidified atmosphere of 5% CO_2, in the absence or presence of concanavalin A (ConA) (1 or 2 µg/ml). Twenty hours before the end of culture, 0.5 µCi/well of [^{3}H]thymidine (specific activity 5 Ci/mmol, CEA, France) diluted in 50 µl was added. Cells were collected on fiberglass strips using a multiple harvester, and radioactivity determined in a liquid scintillation counter. The results were expressed as stimulation indices, calculated for each animal and each concentration of mitogen as follows: SI=mean cpm of stimulated culture/mean cpm of unstimulated culture.

IL-1 and IL-6 Determinations

IL-1 and IL-6 in the plasma and the hypothalamus were measured using ELISA kits from R&D System (Minneapolis, MN). The hypothalamus was placed in 300 µl of a protease inhibitor cocktail including: 4-(3-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochlorine (AEBSF 2 mM), amino-*n*-caproic acid (100 mM), benzamidine (5 mM), Na_2EDTA (10 mM), ethylmaleimide (5 mM) and iodo acetic acid (5 mM) (Sigma, St Louis, MO). Tissues were ultrasonicated for 10 s at the setting 30. Sonicated samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min. The protein content was determined by the method of Bradford (1976). The assay kit sensitivity was 3 pg/ml. The intra- and inter-assay precisions varied between 2.2 and 6.1% for IL-1 and between 3.4 and 8% for IL-6, depending on the concentration of cytokines.

Statistical Analysis

All data were analyzed by analysis of covariance (using the GLM procedure of SAS) taking the lateralization score as a covariate, and taking into account all the possible interactions. When an interaction or a variable had no effect, it was removed from the model. Because no effect of lateralization was seen for all the parameters measured, the final model only took into account the LPS injection, the restraint stress and their interaction, except in the case of IL-1. The resulting two-way ANOVAs were followed by a least square means *post-hoc* analysis. Plasma concentrations of corticosterone and IL-1 were analyzed after square root transformation, and plasma IL-6 after $\log(x+1)$ transformation. In the case of IL-1, data were

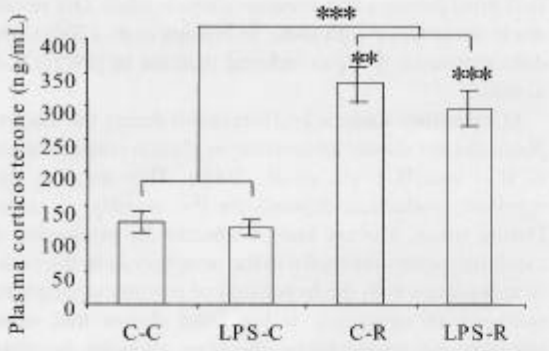


FIGURE 1 Plasma concentrations of corticosterone (ng/ml, mean ± sem) in control (C-C, $n = 24$), LPS-pretreated (LPS-C, $n = 24$), restrained (C-R, $n = 23$) and restrained and LPS-pretreated (LPS-R, $n = 22$) groups. $^{***}P < 0.001$.

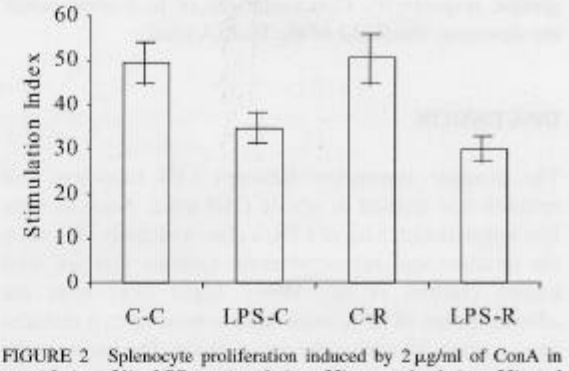


FIGURE 2 Splenocyte proliferation induced by 2 μg/ml of ConA in control ($n = 21$), LPS-pretreated ($n = 22$), restrained ($n = 23$) and restrained and LPS-pretreated ($n = 24$) groups. The results are expressed as stimulation index (mean ± sem).

then analyzed independently for left- and right-pawed groups (lateralization score < 21 and > 30, respectively).

RESULTS

Plasma Concentrations of Corticosterone

Restraint induced a clear increase in plasma corticosterone concentration ($F(1,92)=59.75$, $P < 0.001$, Fig. 1). However, no LPS × restraint interaction ($P > 0.1$) or LPS effect ($P > 0.1$) were found.

Concanavalin A-induced Lymphoproliferation

For lymphocyte proliferation induced by 2 μg of concanavalin A, there was no LPS × restraint interaction ($P > 0.1$) and no effect of restraint ($P > 0.1$), but an effect of LPS ($F(1,88)=4.58$, $P < 0.05$, Fig. 2). Indeed, LPS decreased lymphoproliferation ($P < 0.001$). With 1 μg ConA, a similar pattern of lymphocyte reactivity was observed, but the differences did not reach statistical significance (data not shown).

Interleukin (IL)-1 and IL-6 Determinations

For plasma IL-1, there was a restraint × LPS interaction just below statistical significance ($F(1,75)=3.76$, $P=0.06$), a LPS effect ($P < 0.05$) and a restraint effect ($P < 0.001$). Plasma concentrations of IL-1 were higher in the C-R ($P < 0.001$) and in the LPS-R groups ($P < 0.05$) than in the C-C group. These effects were due to the right-pawed group, as shown in Fig. 3, where the interaction LPS × restraint was significant ($F(1,24)=8.1$, $P < 0.01$). Furthermore, plasma concentrations of IL-1 in the LPS-R right-pawed group were lower than those observed in the C-R group ($P < 0.01$). In the left-pawed group, the interaction between LPS and restraint was not significant ($P > 0.1$). For plasma concentrations of IL-6, no restraint × LPS interaction ($P > 0.1$) or LPS effect was revealed ($P > 0.1$), but there was a restraint effect ($F(1,93)=7.92$, $P < 0.01$). The C-R group exhibited higher plasma concentrations of IL-6 than controls ($P < 0.05$).

The contents of IL-1 and IL-6 were also determined in the hypothalamus. No differences among the experimental groups were observed. IL-6 concentrations, expressed as pg/mg protein, were 11.4 ± 0.8, 12.3 ± 0.9, 12.4 ± 1.4 and 13.3 ± 0.7 in the C-C, C-R, LPS-C and LPS-R

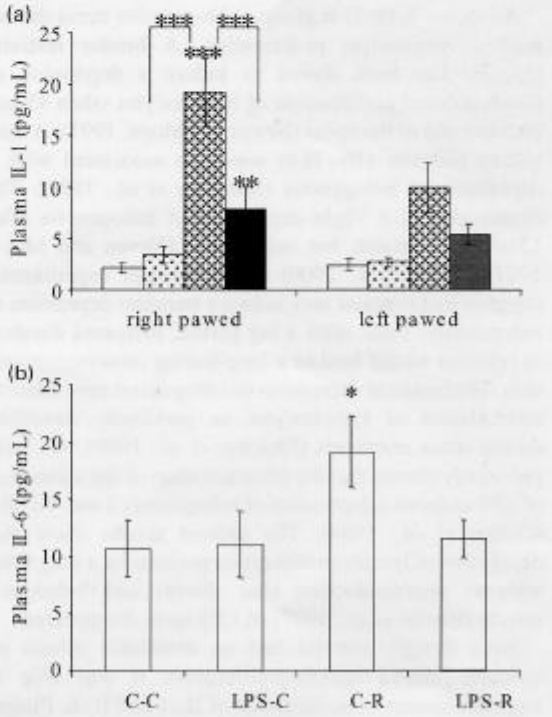


FIGURE 3 A: Plasma concentrations of IL-1 (pg/ml, mean ± sem) in control (□, $n = 19$), LPS-pretreated (▨, $n = 19$), restrained (▧, $n = 18$) and restrained and LPS-pretreated (■, $n = 20$) groups. B: Plasma concentrations of IL-6 (pg/ml, mean ± sem) in control ($n = 24$), LPS-pretreated ($n = 24$), restrained ($n = 24$) and restrained and LPS-pretreated ($n = 22$) groups. $^{***}P < 0.001$, $^{**}P < 0.01$, $^{*}P < 0.05$.

groups, respectively. Concentrations of IL-1 were below the detection threshold of the ELISA used.

DISCUSSION

The possible interaction between LPS treatment and restraint was studied in female C3H mice. Animals were first injected with 5 μg of LPS, a dose with early effects on the immune and neuroendocrine systems that are well known (Delrue *et al.*, 1994). Eight days after the administration of LPS, mice were submitted to a restraint stress lasting 4 h during the active phase. The main results of the present work were that: (1) restraint was able to induce the production of plasma IL-1 and IL-6; and (2) these increased levels of cytokines were reduced in restrained mice when pretreated with LPS.

Most of the interactions between immune and non-immune stimulations that have been already published concern the activity of the HPA axis and especially the plasma concentration of ACTH (Mekaouche *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1995; Weidenfeld and Yirmiya, 1996). In the present experiment, there was no interaction between administration of LPS and restraint for the production of corticosterone: plasma levels of corticosterone were increased after restraint, whether or not the animals were pretreated with LPS. Similar results were obtained when measuring plasma levels of ACTH (data not shown).

As shown in the C-R group, a 4 h-restraint stress did not modify lymphocyte proliferation. A briefer restraint (15 min) has been shown to induce a depression of ConA-induced proliferation of lymphocytes taken 45 min after the end of the stress (Neveu and Moya, 1997). A long lasting restraint (16–18 h) was also associated with a depression of mitogenesis (Sheridan *et al.*, 1991). The observation of a slight depression of mitogenesis after 15 min of restraint, but not after 1 (Neveu and Moya, 1997), 2 (Li *et al.*, 2000) or 4 h (present experiments) suggests that restraint may induce a transient depression of mitogenesis. Then, after a lag period, increased duration of restraint would lead to a long-lasting immunosuppression. The transient depression of mitogenesis may relate to recirculation of lymphocytes as previously described during stress responses (Dhabbar *et al.*, 1995). We have previously shown that the administration of the same dose of LPS induced a depression of mitogenesis 2 and 4 h later (Delrue *et al.*, 1994). The present results show that depression of lymphoproliferation persists for a long time, whereas neuroendocrine (see above) and behavioral effects (Bluthé *et al.*, 1997) of LPS have disappeared.

Even though restraint had no detectable effects on mitogen-induced lymphoproliferation, it was able to augment plasma concentrations of IL-1 and IL-6. Plasma and brain levels of cytokines have been shown to be increased after exhausting stress in rats (Minami *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1993; Takaki *et al.*, 1994; Shintani *et al.*, 1995; Shizuya *et al.*, 1998). To our knowledge, the present results are the first demonstration of an increase of plasma IL-1 level during a non-immune stress in mice. Our results are in accordance with those of Nukina *et al.* (2001) who demonstrated a restraint induced increase in plasma IL-6 in mice.

In a previous study, a 1–2 h-restraint during the inactive phase did not induce an increase in plasma concentrations of IL-1 and IL-6 (Li *et al.*, 2000). This suggests that cytokine production depends on the severity of stress. During stress, it is not known whether the production of cytokines occurs primarily in the periphery or in the brain. In accordance with the hypothesis of a primary peripheral synthesis of cytokines, it has been shown that stress increases gut permeability, therefore allowing intestinal endotoxins to stimulate the production of cytokines (Yagi *et al.*, 1997). Similarly, different stressors, including restraint, increase cutaneous permeability (Denda *et al.*, 2000). Such alterations could be indirectly responsible for the production of cytokines. Consequently, peripheral cytokines could induce the production of brain cytokines. Indeed, LPS-stimulated production of peripheral cytokines has been shown to induce the synthesis of brain cytokines (Layé *et al.*, 1994). It is also possible that during stress, cytokines are first produced in the brain and thereafter stimulate the production of cytokines in the periphery. Such a possibility is supported by the fact that the intra-cerebroventricular injection of IL-1 has been shown to induce high levels of plasma IL-6 (De Simoni *et al.*, 1990; Liège *et al.*, 2000), even though the mechanisms involved are not yet fully understood. However, in the present experiment, we were unable to demonstrate an increased IL-1 and IL-6 production in the hypothalamus. Interestingly, the stress-induced increase in plasma IL-1 occurred in right-, but not in left-pawed mice. This result is in agreement with our previous data if we consider that an increase in plasma IL-1 level is a stress marker. Indeed, as compared to left-pawed mice, right-pawed animals were shown to be more sensitive to restraint (Neveu and Moya, 1997), LPS (Delrue *et al.*, 1994), or IL-1 (Neveu *et al.*, 1998) when measuring endocrine, immune, or behavioral responses.

One week after the administration of LPS, there was no increase in plasma concentrations of IL-1 and IL-6. It is well known that LPS induces the production of cytokines, especially IL-1 and IL-6, but the increase of their concentrations in plasma occurs very shortly after injection (Schöbitz *et al.*, 1994). Interestingly, IL-1 was decreased in the LPS-R group as compared to the C-R group. Such an interaction between stresses was observed by Nagano *et al.* (1999) who showed that the increased plasma levels of IL-1 induced by LPS were decreased by previous repeated injections of LPS during 8 days.

Several hypotheses may be proposed to explain the finding that LPS prevented the restraint-induced increase in plasma cytokine concentration. First, LPS could depress the synthesis of cytokines. Second, LPS and cytokines are known to induce soluble cytokine receptors and binding proteins that can inhibit or increase cytokine activity (Fernandez-Botran *et al.*, 1996). Binding of cytokines to

soluble receptors or non-receptor proteins can interfere with the detection of cytokines using ELISAs (Krakauer and Krakauer, 1999). Finally, LPS is well known to induce the production of acute phase proteins including proteases that have been supposed to play a role in the cytokine network (Fernandez-Botran *et al.*, 1996). Moreover, the production of peptidases such as DPP IV (or CD 23) has been shown to be inversely correlated to the production of IL-6 (Maes *et al.*, 2001).

In summary, this study leads to important conclusions: (1) restraint, that may be considered as a mild psychological stress, is able to increase the concentrations of plasma cytokines in mice; and (2) the increase in plasma cytokines was not observed in mice previously treated with LPS. The present data suggest that LPS may induce long-lasting mechanisms that limit the availability of cytokines and therefore limit chronic inflammatory processes.

Acknowledgements

This work was supported by the INSERM and the DGA (agreement no. 00.34.060.00.470.75.01).

References

Andrès, R., Marti, O. and Armario, A. (1999) "Direct evidence of acute stress-induced facilitation of ACTH response to subsequent stress in rats", *Am. J. Physiol.* **277**, R863–R868.

Besedovsky, H.O. and Del Rey, A. (1996) "Immune–neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses", *Endoc. Rev.* **17**, 64–102.

Betancur, C., Neveu, P.J. and LeMoal, M. (1991) "Sex and strain differences in the degree of paw preference in mice", *Behav. Brain Res.* **45**, 97–101.

Bluthé, R.M., Michaud, B., Kelley, K.W. and Dantzer, R. (1997) "Cholecystokinin receptors do not mediate the behavioral effects of lipopolysaccharide in mice", *Physiol. Behav.* **62**, 385–389.

Bradford, M. (1976) "A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms of protein utilizing the principle of protein–dye binding", *Annal. Biochem.* **72**, 248–254.

De Simoni, M.G., Sironi, M., De Luigi, A., Manfridi, A., Mantovani, A. and Ghezzi, P. (1990) "Intracerebroventricular injection of interleukin-1 induces high circulating levels of interleukin 6", *J. Exp. Med.* **171**, 1773–1778.

Delrue, C., Deleplanque, B., Rouge-Pont, F., Vitiello, S. and Neveu, P.J. (1994) "Brain monoaminergic, neuroendocrine, and immune responses to an immune challenge in relation to brain and behavioral lateralization", *Brain Behav. Immun.* **8**, 137–152.

Denda, M., Tsuchiya, T., Elias, P.M. and Feingold, K.R. (2000) "Stress alters cutaneous permeability barrier homeostasis", *Am. J. Physiol.* **278**, R367–R372.

Dhabbar, F.S., Miller, A.H., McEwen, B.S. and Spencer, R.L. (1995) "Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms", *J. Immunol.* **154**, 5511–5527.

Fernandez-Botran, R., Chilton, P.M. and Ma, Y. (1996) "Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy", *Adv. Immunol.* **63**, 269–336.

Krakauer, T. and Krahauer, H. (1999) "A method for correcting for the variability of inhibitory effects of soluble human interleukin 1 receptor II measured by different ELISAs", *J. Immunoassay* **20**, 185–200.

Layé, S., Parnet, P., Goujon, E. and Dantzer, R. (1994) "Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice", *Mol. Brain Res.* **27**, 157–162.

Li, K.S., Liège, S., Moze, E. and Neveu, P.J. (2000) "Plasma corticosterone and immune reactivity in restrained C3H mice", *Stress* **3**, 285–298.

Liège, S., Layé, S., Li, K.S., Moze, E. and Neveu, P.J. (2000) "Interleukin-1 receptor accessory protein (IL-1RAcP) is necessary for centrally mediated neuroendocrine and immune responses to IL-1β", *J. Neuroimmunol.* **110**, 134–139.

Maes, M., Capuron, L., Ravaud, A., Gualde, N., Bosmans, E., Egyed, B., Dantzer, R. and Neveu, P.J. (2001) "Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity is associated with depressive symptoms and cytokine production in cancer patients receiving interleukin-2-based immunotherapy", *Neuropsychopharmacology* **24**, 130–140.

Marti, O., Andrès, R. and Armario, A. (1999) "Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status", *Am. J. Physiol.* **277**, R869–R877.

Mekaouche, M., Givalois, L., Barbanel, G., Siaud, P., Maurel, D., Malaval, F., Bristow, A.F., Boissin, J., Assenmacher, I. and Ixart, G. (1994) "Chronic restraint enhances interleukin-1-beta release in the basal state and after an endotoxin challenge, independently of adrenocorticotropin and corticosterone release", *Neuroimmunomodulation* **1**, 292–299.

Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y. and Satoh, M. (1991) "Immobilization stress induces interleukin-1β mRNA in the rat hypothalamus", *Neurosci. Lett.* **123**, 254–256.

Nagano, I., Takao, T., Nanamiya, W., Takemura, T., Nishiyama, M., Asaba, K., Makino, S., De Souza, E.B. and Hashimoto, K. (1999) "Differential effects of one and repeated endotoxin treatment on pituitary-adrenocortical hormones in the mouse: role of interleukin-1 and tumor necrosis factor-α", *Neuroimmunomodulation* **6**, 284–292.

Neveu, P.J. and Moya, S. (1997) "In the mouse, the corticosteroid stress response depends on lateralization", *Brain Res.* **749**, 344–346.

Neveu, P.J., Bluthé, R.-M., Liège, S., Moya, S., Michaud, B. and Dantzer, R. (1998) "Interleukin-1-induced sickness behavior depends on behavioral lateralization in mice", *Physiol. Behav.* **63**, 587–590.

Nukina, H., Sudo, N., Aiba, Y., Oyama, N., Koga, Y. and Kubo, C. (2001) "Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice", *J. Neuroimmunol.* **115**, 46–52.

Schmidt, E.D., Janszen, A.W.J.W., Wouterlood, F.G. and Tilders, F.J.H. (1995) "Interleukin-1-induced long lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH)-neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis", *J. Neurosci.* **15**, 7417–7426.

Schöbitz, B., Reul, J.M.H.M. and Holsboer, F. (1994) "The role of the hypothalamic–pituitary–adrenocortical system during inflammatory conditions", *Crit. Rev. Neurobiol.* **8**, 263–291.

Sheridan, J.F., Feng, N., Bonneau, R.H., Allen, C.M., Hunneycutt, B.S. and Glaser, R. (1991) "Restraint stress differentially affects anti-viral cellular and humoral responses in mice", *J. Neuroimmunol.* **31**, 245–255.

Shintani, F., Nakaki, T., Kanba, S., Sato, K., Yagi, G., Shiozawa, M., Aiso, S., Kato, R. and Asai, M. (1995) "Involvement of interleukin-1 in immobilization stress-induced increase in plasma adrenocorticotropic hormone and in the release of hypothalamic monoamines in the rat", *J. Neurosci.* **15**, 1961–1970.

Shizuya, K., Komori, T., Fujiwara, R., Miyahara, S., Ohmori, M. and Nomura, J. (1997) "The influence of restraint stress on the expression of mRNA for IL-6 and the IL-6 receptor in the hypothalamus and midbrain of the rat", *Life Sci.* **61**, PL135–PL140.

Takaki, A., Huang, Q.H., Somogyvari-Vigh, A. and Arimura, A. (1994) "Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines", *Neuroimmunomodulation* **1**, 335–342.

Weidenfeld, J. and Yirmiya, R. (1996) "Effects of bacterial endotoxin on the glucocorticoid feedback regulation of adrenal response to stress", *Neuroimmunomodulation* **3**, 352–357.

Yagi, S., Takaki, A., Ito, K., Maeda, M. and Hori, T. (1997) "Changes in IL-6 and LPS levels in the hepatoportal vein during non-inflammatory stress in rats", *Soc. Neurosci. Abstr.* **23**, 2824.

Zhou, D., Kusnekov, A.W., Shurin, M.R., De Paoli, M. and Rabin, B.S. (1993) "Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin-6: relationship to the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis", *Endocrinology* **133**, 2523–2530.

Discussion Générale

Dans quelles conditions l'environnement social est-il capable d'affecter le système immunitaire?

I. Dans un environnement social stable

Le premier objectif de cette thèse était de déterminer dans quelles conditions l'environnement social est en mesure d'influencer le fonctionnement du système immunitaire. D'après les données de la littérature, il est difficile de déterminer si, chez la souris, au sein d'une structure hiérarchique stable, les différents rangs sociaux sont associés à un fonctionnement différent des systèmes neuroendocrinien et immunitaire. Dans l'étude présentée au chapitre 4, l'influence du statut social sur l'activité endocrinienne et la réactivité immunitaire a été étudiée sur des souris mâles logées en groupe depuis au moins deux mois, en dehors de tout autre facteur de stress que les conditions de logement elles-mêmes.

A. Activité endocrinienne

Chez les rongeurs, l'étude de la structure sociale est souvent approchée par celle des interactions agressives (Blanchard *et al.*, 1988; Drews, 1993). De nombreux travaux se sont intéressés à des situations où des animaux non familiers sont regroupés. Dans ce type de situations, les perdants sont plus affectés que les gagnants. Les perdants sont souvent appelés « dominés » et les gagnants « dominants». Ces études sont à l'origine de la croyance selon laquelle être dominé serait stressant (Creel, 2001). Pourtant, les résultats concernant des groupes stabilisés de longue date suggèrent que les dominés ne sont pas nécessairement stressés. En effet, nos travaux révèlent que les souris occupant un rang de dominé présentent des niveaux de base de corticostérone inférieurs à ceux des dominants (4ème chapitre). Ce résultat est en accord avec les observations réalisées dans d'autres études (Haemisch *et al.*, 1994; Sheridan *et al.*, 2000). Cependant, des niveaux de glucocorticoïdes similaires pour tous les statuts ont aussi été parfois rapportés (Bartolomucci *et al.*, 2003; Ely and Henry, 1978; Koyama and Kamimura, 2000; Van Loo *et al.*, 2001). Ces différences d'une étude à l'autre peuvent être dues à la difficulté de prélever du sang chez la souris de façon non stressante. De plus, il est possible que les différences entre rangs ne se voient pas à tous les moments du

cycle nycthéméral des glucocorticoïdes. Les taux plus élevés de glucocorticoïdes chez les dominants ont été interprétés comme reflétant le «coût » biologique de la dominance (Creel, 2001).

Un argument supplémentaire en faveur de l'absence de stress chez les dominés est que dominants et dominés ne présentent pas de différences pour des critères tels que le seuil de douleur, la taille du thymus et de la rate qui permettent classiquement de déceler un état de stress (Vekovishcheva *et al.*, 2000). Ces résultats se placent dans un contexte où le groupe social est stable et donc où les interactions agressives sont rares. Chez les souris mâles âgées, l'agressivité entre individus peut augmenter et certains dominés peuvent être agressés et blessés de façon chronique. Dans ces conditions, il est probable que les niveaux de base de corticostérone soient inversés et que les dominés présentent alors des niveaux plus élevés que les dominants.

B. Réactivité immunitaire

Le fonctionnement du système immunitaire étant modulé par les glucocorticoïdes, nous avons cherché à déterminer si le rang social influence aussi le fonctionnement du système immunitaire. En l'absence de toute infection, aucune différence entre statuts n'a pu être mise en évidence au niveau de la réponse humorale primaire, la prolifération des splénocytes en réponse au LPS et la production de cytokines par ces mêmes cellules. Ces résultats sont en accord avec ceux de Bartolomucci *et al.* (2003). Donc, en l'absence d'infection, le statut social ne semble pas affecter le système immunitaire. Puisque les dominants présentent des niveaux de base de corticostérone supérieurs aux dominés, cela implique que les différences de corticostérone circulante n'affectent pas de façon significative le système immunitaire. Cette absence d'effet pourrait être due à une moindre sensibilité des dominants aux glucocorticoïdes. Or nous avons trouvé que la sensibilité des splénocytes à l'effet inhibiteur de la corticostérone est similaire quel que soit le statut social (données non publiées). Dans cette étude, l'activité du système sympathique n'a pas été étudiée, mais il semble que les dominants présentent une activité sympathique supérieure aux dominés (Haemisch *et al.*, 1994). Une autre explication possible serait donc que les catécholamines contrecarrent les effets des glucocorticoïdes.

Pourtant, de nombreuses études suggèrent des différences de susceptibilité aux virus, aux parasites et à la croissance tumorale entre dominants et dominés (Ebbesen *et al.*, 1991; Grimm

et al., 1996; Schuster and Schaub, 2001; Schuster and Schaub, 2001). Les dominants sont généralement plus résistants que les dominés. Nous avons tenté de trouver une explication à ce phénomène en analysant la réponse immune d'animaux infectés par la bactérie BCG (4ème chapitre). Vingt-et-un jours après l'infection, la réponse des splénocytes à une stimulation à la tuberculine indique que le développement de l'immunité acquise contre le BCG est d'autant plus important que le rang social augmente. Les animaux produisent d'autant plus d'IFN-γ et d'IL-10 en réponse à la tuberculine que leur rang est élevé. Ceci indique que les dominants répondent plus fortement à l'antigène, mais leur réponse n'est pas mieux orientée en terme de balance Th1/Th2 que celle des dominés. Au bout de trois mois d'infection, les deux catégories d'animaux présentent des réponses spécifiques comparables. Ceci suggère qu'il existe des différences de cinétique dans le développement de l'immunité acquise, les dominants développant une réponse plus rapidement que les dominés. Cependant, la plus forte réponse des lymphocytes des dominants au jour 21 ne semble pas conférer une meilleure résistance à la bactérie puisque la charge bactérienne est similaire quel que soit le statut. Cette différence de cinétique pourrait malgré tout être impliquée dans les différences de susceptibilité à des infections par des pathogènes plus virulents que le BCG.

Un autre facteur pouvant favoriser la résistance des dominants concerne l'immunité innée. Nous ne disposons d'aucun élément à ce sujet puisque l'influence du statut social sur les fonctions de l'immunité innée (activité antimicrobienne des macrophages, cytotoxicité NK, etc) n'a été étudiée ni dans le cadre de cette thèse, ni dans la littérature.

Tableau 3 : Influence du statut social sur l'activité endocrinienne et la réactivité immunitaire (synthèse des résultats de la thèse).

	dominants	**subordonnés**
Activité endocrinienne :		
Corticostérone	élevée	basse
Réactivité inflammatoire :		
Prolifération (mitogène : LPS)	=	=
Production d'IL-6 (mitogène : LPS)	=	=
Sensibilité à la corticostérone	=	=
Fonction des lymphocytes T :		
Acquisition de l'immunité spécifique (antigène : tuberculine)	rapide	lente
Résistance au BCG	=	=

En conclusion, dans un environnement social stable, les souris dominantes présentent des niveaux de corticostérone circulante plus élevés que les dominées, et semblent développer une immunité anti-BCG plus rapidement (tableau 3). Ces données révèlent que l'environnement social, même en conditions stables, influence de façon non négligeable le fonctionnement des systèmes neuroendocrinien et immunitaire.

II. Dans un environnement social instable

L'influence d'un environnement social instable, le plus souvent créé par des situations de confrontation entre individus étrangers, a été plus amplement étudiée et il n'y a plus de doutes sur le fait que le stress social affecte de nombreux paramètres immunitaires. En revanche, nous avons vu que selon les cas, le stress social pouvait augmenter la prolifération des splénocytes, la diminuer ou ne pas l'affecter (Bohus *et al.*, 1993; Cacho *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 1990; Raab *et al.*, 1986). D'autre part, il est difficile de dire si le regroupement social a des conséquences stressantes uniquement pour les dominés ou bien pour les deux catégories d'animaux.

A. Effet d'un regroupement unique

1) Conséquences comportementales et endocriniennes

Les conséquences comportementales, endocriniennes et immunitaires d'un unique regroupement d'animaux ont été étudiées chez le porcelet (1er chapitre). La procédure de stress consistait à introduire deux porcelets issus d'une même portée dans une autre portée de quatre individus. Cette étude a montré que le regroupement est un événement stressant quel que soit le statut social obtenu à l'issue des combats et que la réponse des glucocorticoïdes juste après le regroupement est supérieure chez les perdants. Vainqueurs et perdants montrent des tentatives d'adaptation comportementale à la situation en désynchronisant leurs activités d'avec le reste du groupe. Ceci peut être interprété comme un comportement d'évitement visant à limiter le nombre de rencontres avec les résidents. Le fait que les animaux présentent le même type de réponse endocrinienne et comportementale quelle que soit l'issue des combats suggère que le stress est de même nature pour les deux catégories d'animaux et qu'il est juste plus intense chez les perdants.

Les réponses endocrinienne et comportementale ont été suivies pendant quatre jours après le regroupement. Cette étude cinétique montre que la réponse corticotrope au stress social est transitoire. Ceci est en accord avec des études précédentes réalisées chez le porc (Blecha *et al.*, 1985; Deguchi and Akuzawa, 1998; Ruis *et al.*, 2001). De même, chez les rongeurs, en situation de cohabitation avec un individu initialement étranger, dominant et dominé finissent par présenter des concentrations de corticostérone similaires aux concentrations avant le stress (Fano *et al.*, 2001; Stefanski, 2000). Cependant, il est possible que le stress induit par un regroupement soit plus important chez les rongeurs, car le retour à des concentrations basales est beaucoup plus lent que chez le porc (supérieur à une semaine). Dans notre étude, la désynchronisation comportementale dure pendant trois jours, montrant que la situation demeure stressante pendant au moins trois jours, probablement parce que la structure hiérarchique définitive du groupe n'est pas encore stabilisée.

2) Conséquences immunitaires

Dans cette étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'effet du regroupement sur les variables immunitaires mesurées, ni trois heures, ni trois jours après le stress. Cette absence d'effet du stress aigu s'oppose aux résultats obtenus chez des porcs un peu plus âgés où la prolifération des lymphocytes sanguins est inhibée par un regroupement (Deguchi and Akuzawa, 1998; Hessing *et al.*, 1995). Cette inhibition est visible dès 24 heures et peut durer 26 jours après le regroupement (Deguchi and Akuzawa, 1998). L'absence d'effet du regroupement sur les lymphocytes peut avoir deux causes. D'une part, le stress provoqué chez les porcelets était peut-être trop modéré. Cela pourrait être dû au jeune âge des animaux, pour lequel la structure sociale est peut-être moins importante qu'à un âge plus avancé. En effet, d'autres études sur porcelets récemment sevrés n'ont pas observé d'effet du stress social sur la prolifération lymphocytaire (Blecha *et al.*, 1985; Puppe *et al.*, 1997). Une autre raison pourrait être la proximité du sevrage qui a eu lieu cinq jours avant le regroupement. Le sevrage affecte le système immunitaire et est associé à des troubles digestifs (Madec *et al.*, 1998; Puppe *et al.*, 1997). Le système immunitaire des porcelets, déjà stimulé par l'important stress du sevrage, pourrait être temporairement insensibilisé à la survenue d'un nouveau stress, mineur au regard des perturbations déjà endurées.

D'après la littérature, les conséquences sur l'immunité d'une unique défaite sont de relativement courte durée chez la souris. Ainsi, une unique et brève défaite (animaux séparés dès que l'un montre des postures de soumissions) supprime de façon transitoire la réponse à

une inoculation d'herpès virus : la réponse est inhibé un jour après le stress, mais est similaire aux témoins au bout de dix jours (de Groot *et al.*, 1999).

B. Effet de l'instabilité sociale chronique

1) Conséquences endocriniennes

En condition d'instabilité sociale chronique, les données sont contradictoires quant à la réponse de l'axe corticotrope au stress. Dans le cas du SDR, nous avons pu constater que la réponse de la corticostérone décroît entre la première et la sixième session de stress, suggérant un phénomène d'habituation (2ème et 5ème chapitres). Ce résultat est en désaccord avec les observations rapportées par Avitsur (Avitsur *et al.*, 2001). Dans cette étude, la souche de souris C57Bl/6 avait été utilisée et non la Balb/c. Il est possible qu'il existe des différences d'émotivité entre ces deux lignées lors du stress social. De plus, nous ne pouvons pas être sûrs que les intrus utilisés par cette équipe présentaient une agressivité similaire aux nôtres. Des animaux plus agressifs pourraient provoquer un stress supérieur et empêcher ou ralentir le phénomène d'habituation.

Il semble que la procédure de stress social utilisée détermine la possibilité pour l'animal de s'adapter ou non à la défaite. Ainsi, dans les procédures de stress où le dominé demeure en contact sensoriel permanent avec le dominant et n'est exposé aux attaques de ce dernier que pendant quelques minutes par jours, il semble que la réponse de la corticostérone s'accroisse à chaque nouvelle confrontation (Fano *et al.*, 2001; Keeney *et al.*, 2001). En revanche, lorsqu'il n'y a pas de contact sensoriel entre les rencontres, la réponse corticotrope peut décroître à chaque nouvelle confrontation (Cacho *et al.*, 2003 ; 2ème chapitre).

L'importance du statut social obtenu à l'issue des interactions n'a pas été étudié dans le cas d'un stress chronique, puisque nous avons volontairement utilisé une procédure imposant une défaite sociale à chaque rencontre. Cependant, cet aspect est déjà connu. Des procédures impliquant des confrontations journalières entre les mêmes partenaires montre que les niveaux de corticostérone ne continuent à monter que chez les perdants (Fano *et al.*, 2001; Raab *et al.*, 1986).

2) Conséquences immunitaires

Le fait qu'un stress social chronique puisse modifier le fonctionnement du système immunitaire est aujourd'hui bien connu (voir partie « Objectifs de la thèse »). En revanche, la nature des ces altérations et leurs conséquences sur la santé de l'animal sont moins bien comprises. L'effet de la défaite sociale chronique sur la production de cytokines fait l'objet du chapitre suivant.

Comment la défaite sociale module-t-elle la production de cytokines?

I. Production d'IL-6 plasmatique

Nous avons montré que le stress social entraîne une libération d'IL-6 dans le plasma (2ème et 5ème chapitres). Plusieurs arguments suggèrent que la cytokine n'est pas libérée au niveau des blessures cutanées produites lors des combats mais présente la même origine que l'IL-6 retrouvée après de nombreux autres stress psychologiques. Le fait que les concentrations d'IL-6 soient plus élevées dans le groupe SDR que dans le groupe où les combats sont limités aurait pu suggérer un rôle des blessures (5ème chapitre). Cependant, le nombre de blessures augmente avec le nombre de sessions, alors que la production d'IL-6 diminue entre la première et la dernière session de stress. Une étude cinétique réalisée chez le rat montre que lors de l'injection sous-cutanée de 10^7 à 10^9 CFU d'E.Coli, des niveaux détectables d'IL-6 ne sont atteints dans le sang qu'au bout de six heures (Campisi *et al.*, 2003). Or dans notre modèle, les niveaux d'IL-6 atteignent déjà près de 300 pg/ml deux heures après le début du stress (alors que les concentrations basales sont proches de zéro). Il est peu probable que les blessures, localisées et superficielles, puissent induire une réponse inflammatoire systémique aussi rapide et d'une telle ampleur. A supposer que les blessures aient pu induire une réponse inflammatoire d'une telle ampleur, il est alors surprenant que les concentrations d'IL-6 au moment du sacrifice, c'est-à-dire environ 17 heures après la dernière session de stress, soient revenues à un niveau basal.

En revanche, la libération d'IL-6 présente des analogies avec celle qui est observée après n'importe quel autre stress uniquement psychologique. En effet, tout stress suffisamment fort induit une libération d'IL-6 dans le plasma. Une immobilisation (Takaki *et al.*, 1994), la contention (Nukina *et al.*, 2001 et 6ème chapitre), l'exposition à un environnement nouveau (LeMay *et al.*, 1990) ou des chocs électriques (Zhou *et al.*, 1993) induisent la production d'IL-6 plasmatique chez les rongeurs. Comme dans le cas de chocs électriques (Zhou *et al.*, 1993), les niveaux d'IL-6 libérée lors du stress social sont proportionnels à ceux de la corticostérone et il semble que les niveaux soient d'autant plus élevés que le stress psychologique est fort (5ème chapitre).

Au chapitre 6, nous avons montré qu'un stress de contention est capable d'entraîner la libération non seulement d'IL-6, mais aussi d'IL-1β. Ceci est en accord avec les résultats de Hale et al. (Hale *et al.*, 2001; Hale *et al.*, 2003) et montre que, tout comme chez l'homme, le stress n'induit pas une libération spécifique d'IL-6, mais une libération plus généralisée de cytokines inflammatoires chez la souris. Les mécanismes de libération de ces cytokines n'ont pas été étudiés dans cette thèse. Cependant, une indication est donnée par le fait que la libération d'IL-1 est dépendante de la latéralisation cérébrale (6ème chapitre). Or l'influence de la latéralisation cérébrale sur la réponse inflammatoire semble s'exercer via le système sympathique (Delrue-Perollet *et al.*, 1995). Cela suggère que la libération d'IL-1β lors du stress est sous contrôle sympathique. Cette hypothèse est en accord avec la plupart des études concernant les sources possibles d'IL-6 plasmatique. En effet, si ces études proposent des sources différentes, l'IL-6 semble en tout cas être toujours libérée en réponse à une stimulation par les catécholamines (Gornikiewicz *et al.*, 2000; Mohamed-Ali *et al.*, 2001; Takaki *et al.*, 1994; Takaki *et al.*, 1996). Une étude suggère également un contrôle sympathique de l'expression d'IL-1 dans le foie et la rate après stress (Jung *et al.*, 1999).

D'un point de vue méthodologique, il pourrait être intéressant de confirmer que l'IL-6 est libérée suite à une stimulation sympathique et de vérifier ci les niveaux plasmatiques d'IL-6 reflètent de façon satisfaisante l'amplitude de l'activation sympathique. En effet, expérimentalement, la réponse sympathique n'est pas facile à mesurer car les catécholamines sont libérées de façon très rapide après le stress. De plus, comme la moindre perturbation de l'environnement provoque un pic d'activité sympathique, cette mesure est très facilement brouillée par des événements non souhaités (notamment, la réponse au prélèvement sanguin lui-même). L'activation sympathique n'est mesurable précisément que sur animaux cathétérisés ou équipés d'un système de télémétrie permettant de mesurer l'activité cardiaque. A supposer que l'IL-6 soit proportionnelle à l'activité sympathique, étant donné que sa libération est retardée par rapport au stress (Zhou *et al.*, 1993) et qu'elle est beaucoup moins sensible que celle des catécholamines, ce pourrait être un moyen très pratique d'évaluer la réponse sympathique à un stress. Une telle validation est difficile à réaliser chez la souris pour des raisons pratiques. En revanche, elle pourrait être tentée chez le porc.

II. Production de cytokines pro-inflammatoires par les splénocytes

A. Production spontanée

La réponse de splénocytes cultivés en présence d'un mitogène est sensée refléter la réactivité que les cellules auraient montré si elles avaient été stimulées *in vivo* juste avant le sacrifice. Par exemple, en stimulant avec du LPS, on espère évaluer la réactivité à un stimulus inflammatoire. La prolifération ou la libération de molécules par des cellules mises en culture sans ajout de mitogène est quant à elle sensée refléter la production spontanée qui s'exprimait *in vivo* au moment du sacrifice.

Si de nombreuses études montrent que le stress augmente la réactivité des cellules immunitaires à un stimulus inflammatoire, très peu se sont intéressées à la production spontanée de ces cytokines en réponse au seul stress psychologique. Une étude a pu montrer que les macrophages péritonéaux ou alvéolaires issus de souris stressées présentent une production spontanée accrue d'IL-1 et d'IL-6 (Jiang *et al.*, 1990). D'après les résultats de cette thèse, il n'est pas sûr qu'il en soit de même pour les cellules de la rate. Chez la souris Balb/c, les niveaux d'IL-6 et d'IL-10 produites en l'absence de stimulation par un mitogène étaient indétectables. En revanche, nous avons trouvé que le SDR diminuait la production spontanée d'IFN-γ (données non publiées). Chez la souris C3H, les concentrations d'IL-6 et d'IL-10 atteignaient des niveaux quantifiables par ELISA et nous avons trouvé que le stress de contention n'affectait pas significativement la production spontanée d'IL-6 et d'IL-10, même si la production d'IL-6 tendait à diminuer (6ème chapitre). Ces résultats concordent avec ceux de Hale et al. (2003), qui ont trouvé une diminution de l'expression du gène de l'IL-6 dans la rate de souris après une simple manipulation des animaux. Il semble donc qu'en l'absence de stimulus inflammatoire, le stress, défaite sociale comprise, a tendance à diminuer la production spontanée de cytokines inflammatoires dans la rate.

B. Production induite par le LPS

La production de cytokines *in vitro* par les splénocytes stimulés au LPS nous a permis d'étudier l'effet du SDR sur la réactivité inflammatoire des splénocytes. Le SDR accroît de façon significative la production d'IL-6 (2ème et 5ème chapitres) et cet effet persiste 8 jours

après la fin du stress (3ème chapitre). Nous avons montré que la production d'IL-10 en réponse au LPS pouvait aussi être stimulée par le SDR (3ème et 5ème chapitres). Ces deux cytokines ont en réalité une activité anti-inflammatoire (Leclerc, 1996; Tilg *et al.*, 1997), mais leur production témoigne de la réactivité inflammatoire globale des splénocytes. En présence de corticostérone, la production d'IL-6 et d'IFN-γ est moins inhibée chez les animaux stressés que chez les témoins, témoignant d'une diminution de la sensibilité des splénocytes à l'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes (2ème chapitre). Production accrue d'IL-6 et résistance aux glucocorticoïdes sont en accord avec les données de la littérature (Stark *et al.*, 2001) et montrent que le modèle SDR induit un état pro-inflammatoire chez la souris Balb/c (Fig.9).

Cependant, les résultats obtenus au 2ème chapitre montrent que la défaite sociale stimule sélectivement la production de certaines cytokines inflammatoires. En effet, la production d'IL-6 est augmentée dans les surnageants stimulés au LPS, mais celle d'IFN-γ, qui est une cytokine majeure pour l'activation des propriétés antibactériennes des macrophages (Flesch and Kaufmann, 1991), a tendance à être diminuée par le SDR (2ème chapitre). L'IL-6 et l'IL-10, dont nous avons montré que le SDR augmentait la production, ainsi que l'IL-β et le TNF-α, dont l'augmentation a été démontrée par d'autres (Quan *et al.*, 2001), sont majoritairement produites par les macrophages lors d'une stimulation par le LPS. L'IFN-γ peut être aussi en partie libéré par les macrophages (Fultz *et al.*, 1993), mais il semble que les cellules NK et les lymphocytes T en soient les sources principales. Lors d'une stimulation au LPS, la production d'IFN-γ est stimulée par d'autres cytokines telles que l'IL-12, libérées par les macrophages et les cellules dendritiques (Gerosa *et al.*, 2002; Kambayashi *et al.*, 2003). Ce résultat suggère que toutes les fonctions macrophagiques ne sont pas stimulées par le SDR. Il est possible que la fonction de médiateur de l'inflammation soit stimulée mais que la capacité à activer les autres cellules immunitaires soit inhibée. Le dosage de l'IL-12 aurait permis de renforcer cette hypothèse. Malheureusement, les niveaux de production de l'IL-12 dans les surnageants de culture étaient indétectables (2ème chapitre).

III. Absence de déviation vers un profil Th2

Les données de la littérature ne permettent pas de déterminer si l'induction d'un profil pro-inflammatoire par le stress et l'orientation des lymphocytes vers un profil Th2 sont des phénomènes concomitants et s'ils sont indépendants l'un de l'autre. Or l'interrelation entre

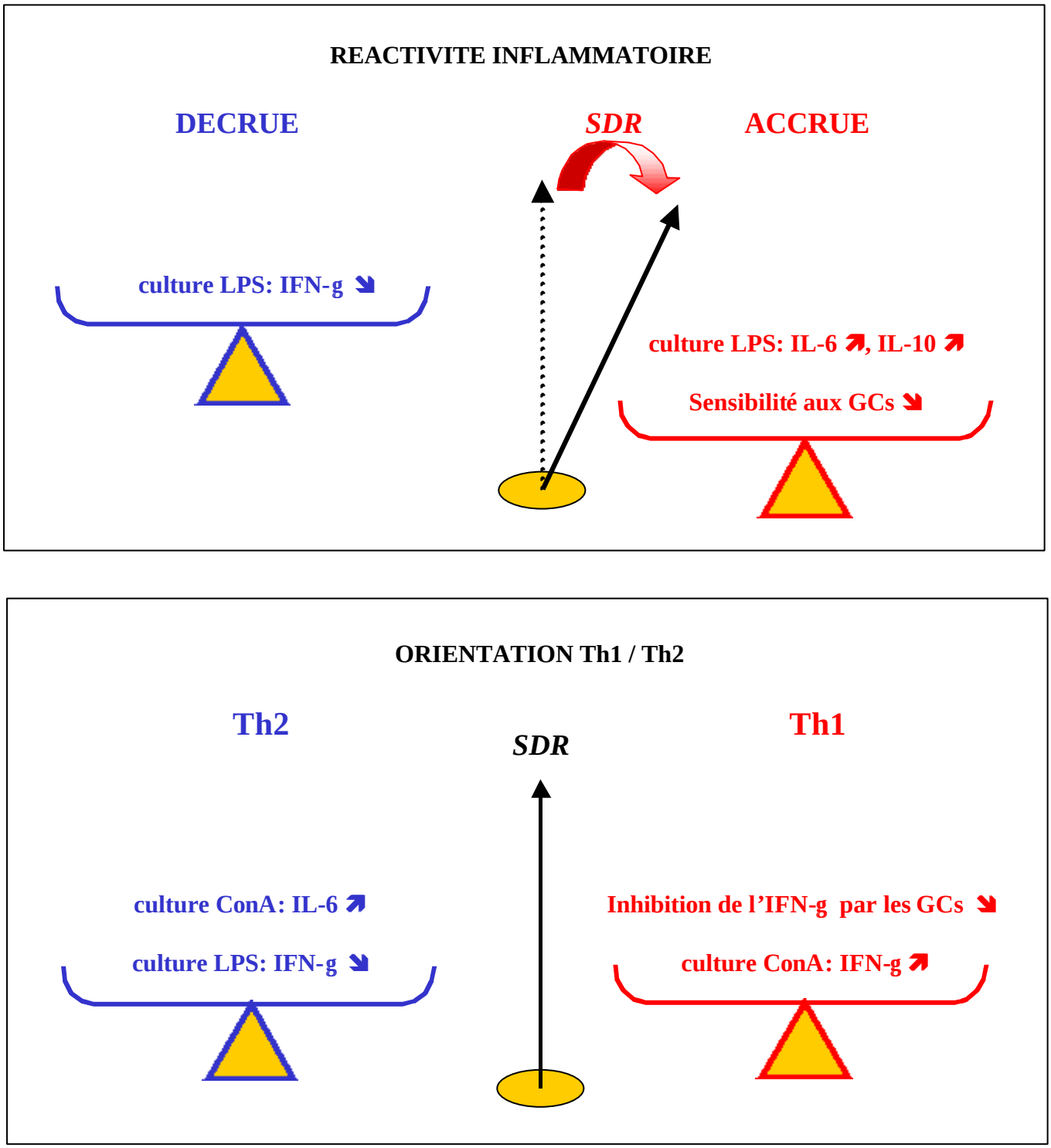


Figure 9: Effets du SDR sur la réactivité inflammatoire et l'orientation Th1 / Th2 des splénocytes.

Arguments en faveur d'une augmentation de la réactivité inflammatoire et de l'orientation vers un profil Th1 ou Th2.

cytokines Th1/Th2 d'une part et pro- / anti-inflammatoire d'autre part est complexe. L'induction d'une réponse de type Th1 semble nécessiter la présence de certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF-α (Herring *et al.*, 2002; Tanigawa *et al.*, 2000). Réciproquement, une réponse de type Th1 induit la libération de cytokines inflammatoires. En produisant de l'IFN-γ, les lymphocytes stimulent les monocytes /macrophages et potentialisent la production d'IL-1, de TNF-α et d'IL-6 en réponse à un stimulus bactérien (Kovalovsky *et al.*, 2000; Trinchieri, 1997). Cependant, lors des réponses allergiques, l'inflammation peut aussi être associée à un profil de type Th2 puisque les principales cytokines impliquées dans l'inflammation d'origine allergique sont l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9 et l'IL-13 (Romagnani, 2001).

L'apparition de résistance aux glucocorticoïdes permettait de soupçonner que le SDR n'aurait pas d'effet pro-Th2. En effet, puisque les glucocorticoïdes favorisent une orientation de la production de cytokines vers un profil de type Th2 (Daynes and Araneo, 1989; DeKruyff *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 1996), la résistance des splénocytes aux glucocorticoïdes devait limiter l'influence Th2 des glucocorticoïdes libérés lors des sessions de stress. Comme attendu, nous avons montré que la diminution de sensibilité aux glucocorticoïdes résulte en une moindre inhibition de la production d'IFN-γ mais n'affecte pas celle d'IL-10 (2ème et 5ème chapitres). Le SDR diminue donc la capacité des glucocorticoïdes à induire (ou à entretenir) une production de cytokines par les splénocytes orientée vers un profil Th2.

Le profil Th1 / Th2 des splénocytes a été étudié au 2ème chapitre. La production de cytokines de type 1 et 2 a été mesurée après stimulation par un mitogène spécifique des lymphocytes T. Nous avons montré que le SDR favorise la production de la cytokine de type 1, IFN-γ, par les lymphocytes et n'affecte que très peu la production d'IL-10. En revanche, elle augmente aussi la libération de la cytokine Th2, IL-6. L'augmentation simultanée de l'IL-6 et de l'IFN-γ ne permet pas de conclure à une dominance du Th1 ou du Th2. De plus, toutes les sources de cytokines interviennent dans la régulation de la balance Th1/Th2. Puisque la production d'IFN-γ est augmentée dans les surnageants stimulés à la concanavaline A, mais diminuée dans ceux stimulés au LPS, il est impossible de savoir si la production d'IFN-γ serait au final augmentée ou diminuée en réponse à un pathogène. Le SDR ne modifie donc pas la balance Th1/Th2 (Fig. 9). de Groot et al. (2002) et Bartolomucci et al. (2001) ont trouvé que le stress social chez la souris diminue de la production de cytokines Th2 et n'affecte pas celle de cytokines Th1. Cependant, en accord avec nos résultats, il n'est pas possible de conclure à un

shift Th1 dans l'étude de de Groot car les deux classes d'anticorps IgG2a et IgG1 se trouvaient simultanément diminuées par le stress social.

L'étude menée au 2ème chapitre concernait la réponse polyclônale des cellules de la rate en réponse à un mitogène. L'étude de l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil de type 1 ou 2 est plus pertinente dans le cadre d'une réponse spécifique à un antigène. Chez des souris infectées par le BCG, le SDR n'induit pas non plus de biais vers un profil Th1 ou Th2 en réponse à la tuberculine (3ème chapitre).

En conclusion, nous avons pu montrer que la défaite sociale répétée n'oriente pas les splénocytes vers un profil Th2. Le rôle de l'effet pro-inflammatoire du SDR dans l'absence d'orientation Th2 est à approfondir.

Quelles sont les conséquences de la défaite sociale (SDR) sur la résistance à une infection par le BCG ?

I. Conséquences du SDR sur une infection au BCG

A. Résultats attendus

Une application du SDR de façon concomitante avec l'injection de BCG aurait probablement diminué la résistance à la bactérie. Immédiatement après une injection de BCG, l'organisme développe une réponse inflammatoire similaire à ce qui peut être observé après une injection de LPS. Les données de la littérature indiquent que le SDR dérégule la réponse inflammatoire et favorise les chocs endotoxiques (Quan *et al.*, 2001). Sheridan et al. ont étudié les effets d'une procédure de stress social chronique assez similaire au SDR sur la réponse au virus de la grippe. Dans cette étude, les animaux ont été infectés par voie intra-nasale pendant la procédure de stress. Le stress induit une réponse inflammatoire pulmonaire disproportionnée et accroît la mortalité (Sheridan *et al.*, 2000). Il est probable que le SDR aurait aussi augmenté la réponse inflammatoire systémique au BCG. De plus, la survenue d'un stress au moment de la première rencontre avec l'antigène inhibe généralement la réponse primaire. Le SDR aurait donc probablement retardé le développement de l'immunité anti-BCG. Notre objectif n'était pas d'observer un emballement de la réponse inflammatoire ni une inhibition de l'initiation de la réponse primaire, mais d'observer les effets sur la balance Th1/Th2 d'un stress survenant lorsque la réponse spécifique anti-BCG est déjà amorcée. Pour cette raison, le stress de défaite sociale n'a pas été appliqué de façon concomitante à l'injection de BCG mais 11 jours plus tard, bien après le pic de la réponse inflammatoire systémique induite par l'injection.

Les résultats du chapitre 2 ont permis de montrer que le SDR est capable de diminuer la sensibilité des splénocytes aux glucocorticoïdes, de stimuler la réactivité pro-inflammatoire des macrophages, et d'accroître la production d'IFN-γ par les lymphocytes. Les glucocorticoïdes ont été présentés comme les principaux responsables de la diminution de la résistance aux mycobactéries lors d'un stress de contention chronique (Brown and Zwilling, 1994; Brown *et al.*, 1995a). En favorisant le développement d'une relative résistance aux

glucocorticoïdes, le SDR devrait donc être moins néfaste que le stress de contention. Il a de plus été suggéré que la résistance aux glucocorticoïdes au niveau tissulaire pourrait être un moyen de favoriser un déplacement vers le Th1 et de favoriser la réponse contre les mycobactéries (Rook *et al.*, 2000). Les souches de souris BCG-sensibles semblent produire avec difficulté des cytokines fondamentales pour une bonne immunité anti-BCG, telles que l'IFN-γ (Roch and Bach, 1991). En augmentant la production d'IFN-γ par les lymphocytes T (chapitre 2), le SDR pourrait favoriser la réponse anti-BCG. En revanche, l'IL-10 s'oppose à une bonne réponse contre les mycobactéries. Elle inhibe la production de cytokines Th1, diminue l'activité bactéricide des macrophages (Trinchieri, 1997) et des souris déficientes pour le gène de l'IL-10 présentent une meilleure résistance aux mycobactéries (Murray and Young, 1999). Le SDR augmente la production d'IL-10 par les macrophages en réponse au LPS, mais cette augmentation n'est pas systématique et est de faible amplitude (chapitres 2, 3 et 5). Par contre, le SDR diminue la production d'IL-10 par les lymphocytes spléniques (chapitre 2). Nous avons donc supposé que le SDR ne devait pas augmenter la susceptibilité des souris Balb/c au BCG mais au contraire pourrait même stimuler les splénocytes et favoriser la résistance à la bactérie.

B. Effets du SDR sur les splénocytes de souris infectées par le BCG

Les résultats du chapitre 3 montrent que la production d'IL-6, d'IL-10 et d'IFN-γ en réponse à la tuberculine est similaire chez les animaux stressés et témoins. Le SDR ne favorise pas l'activation des lymphocytes spécifiques du BCG et ne les oriente pas vers un profil de type Th1. Malgré l'absence d'effets sur les lymphocytes, le SDR aurait pu favoriser la résistance au BCG en agissant directement sur les macrophages. En effet, nous avions supposé que le SDR inhiberait moins la résistance au BCG que le stress de contention utilisé par l'équipe de Sheridan parce que les macrophages des souris stressées par le SDR sont moins sensibles aux glucocorticoïdes. Or, lorsque nous avons cherché à vérifier que les splénocytes des souris du groupe SDR présentaient bien une sensibilité diminuée, nous avons découvert que les animaux infectés par le BCG présentaient la même sensibilité aux glucocorticoïdes dans les groupes SDR et témoin. Le seul effet du SDR que nous ayons retrouvé chez les animaux infectés est une légère augmentation de production d'IL-6 et d'IL-10 en réponse au LPS. Les

effets du SDR sur les macrophages semblent donc être minimes chez des souris préalablement infectées par le BCG.

C. Effet du SDR sur la croissance bactérienne

Lors d'une première répétition, nous avions observé que plus le pelage des animaux était détérioré par le stress, moins le nombre de CFU était élevé. Ces résultats laissaient donc penser que le SDR favorise la résistance à la bactérie. Cependant, lors d'une seconde répétition, la corrélation entre l'état du pelage et le nombre de CFU n'a pas été retrouvée. Les charges bactériennes similaires dans les groupes SDR et témoin sont en accord avec l'absence d'effet du SDR sur les splénocytes.

En accord avec notre hypothèse initiale, le SDR n'a pas augmenté la susceptibilité des souris au BCG. En revanche, il n'a pas non plus stimulé la réponse anti-BCG. Il n'a pas modifié l'orientation Th1/Th2 des lymphocytes spécifiques du BCG et n'a pas modifié la sensibilité des splénocytes à la corticostérone. Cette absence d'effet du stress sur les cellules de la rate contraste de façon surprenante avec les résultats du chapitre 2.

II. Explications possibles de l'absence d'effet du SDR

A. L'intensité du stress

Une première raison pouvant expliquer l'absence d'effet du SDR sur la résistance à la bactérie est que le stress utilisé était trop « faible ». Cet argument est difficilement recevable puisque le protocole de stress impose des sessions de stress longues (deux heures), induisant de nombreuses blessures, et que ce stress est répété six jours. De plus, il a été montré dans d'autres laboratoires que la défaite sociale répétée peut avoir des conséquences dramatiques si une infection par le virus de la grippe (Sheridan *et al.*, 2000) ou une injection d'une forte dose de LPS (Quan *et al.*, 2001) est appliquée pendant le stress. Dans les deux cas, le stress augmente la mortalité par rapport aux animaux témoins. Dans certaines conditions, le SDR est donc un stress suffisamment fort pour modifier la résistance à une stimulation inflammatoire ou infectieuse. Il pourrait être objecté que la procédure de stress telle qu'elle a été reproduite dans notre laboratoire était moins forte que celle utilisée par l'équipe de Sheridan. Cependant, les résultats du chapitre 2 montrent que la procédure que nous avons utilisée induit une forte

réponse de la corticostérone et modifie clairement le fonctionnement des splénocytes à court terme. Le suivi de l'état du pelage au cours des sessions de stress montre que les animaux se sont effectivement battus et ont été blessés lors de l'expérience présentée au chapitre 3. Il est donc peu plausible d'expliquer l'absence d'effets par la « faiblesse » du stress infligé.

B. La cinétique des effets du SDR

Puisque dans notre étude, le délai entre la fin du stress et le sacrifice des animaux était de huit jours, une deuxième raison possible est que les effets du SDR sur la réponse anti-BCG ont pu s'exprimer immédiatement après le SDR mais ont déjà disparu au moment où nous les avons recherchés. Nous disposons de peu d'arguments pour discuter cette hypothèse car nous n'avons pas étudié la cinétique de disparition des effets du SDR. Cependant, nous avons montré que tous les effets du SDR n'ont pas disparu au bout d'une semaine puisque l'accroissement de la production d'IL-6 par le SDR en réponse à une stimulation au LPS est atténué mais toujours visible 8 jours après la fin du stress (chapitre 3). D'après Avitsur (2002), la résistance aux glucocorticoïdes s'atténue avec le temps mais est encore très nette dix jours après l'arrêt du stress chez les souris C57Bl/6. Or la résistance n'a pas été retrouvée chez les souris infectées par le BCG (chapitre 3). Cela laisse penser que la sensibilité aux glucocorticoïdes n'a pas été altérée chez ces animaux.

C. Une désensibilisation au stress due à l'infection

Une dernière hypothèse est que les souris infectées par le BCG sont moins sensibles au stress que les souris non infectées. Ces résultats étant inattendus, le protocole ne prévoyait pas de prélèvements de sang après le SDR comme cela a été réalisé dans d'autres expériences (chapitres 2 et 5). Nous ne pouvons donc pas vérifier que l'amplitude de la réponse de l'axe corticotrope était différente chez les animaux infectés par le BCG en comparaison de celle d'animaux sains.

L'infection par le BCG aurait pu également désensibiliser non pas le système neuroendocrinien mais le système immunitaire. Les conséquences d'un stress psychologique ont toujours été étudiées sur un système immunitaire non stimulé ou bien en appliquant de façon presque simultanée les stimuli psychologiques et immuns. Les conséquences du stress sur un système immunitaire déjà activé sont mal connues. Le temps imparti à la thèse ne nous

a pas permis d'approfondir ce point. Cependant des arguments permettant de discuter cette hypothèse seront exposés dans la partie suivante.

Quelles sont les sources de variabilité dans les conséquences immunitaires de la défaite sociale ?

Une des premières constatations venant à l'esprit lorsque l'on parcourt la littérature concernant les effets sur l'immunité du stress social (et de façon plus générale de tous les types de stress) est l'extrême variabilité de ces effets, allant parfois jusqu'à des résultats contradictoires d'une étude à l'autre. Nous avons vu que le fait de différencier lors du stress social les animaux victorieux des animaux perdants permet de lever une partie de ces contradictions. Cependant, la variabilité demeure forte au sein même d'un modèle tel que le SDR. Pourtant, la procédure a été standardisée le plus possible, que ce soit en terme de durée, de fréquence et de nature du stress (pas de victoires possibles). De plus, la même souche de souris consanguines a été systématiquement utilisée, et les animaux expérimentaux présentaient tous à peu près le même âge d'une expérience à l'autre (entre deux et trois mois).

Nous avons cherché à déterminer si l'histoire de l'individu pouvait influencer la réponse au stress. L'histoire sociale et l'histoire immunitaire de l'individu ont été abordées. L'intensité des combats et des blessures variant beaucoup d'un individu à l'autre et d'une cage à l'autre, nous nous sommes ensuite intéressé à la variabilité du facteur de stress, en étudiant l'importance de l'intensité des combats sur la réponse immunitaire à la défaite.

I. L'histoire de l'individu

A. Importance du statut social

Les résultats du chapitre 4 montrent que l'histoire sociale de l'individu peut intervenir comme source de variabilité lors du SDR. En effet, seuls les dominants présentaient un accroissement significatif de la prolifération des splénocytes en réponse au LPS et ils étaient significativement plus blessés que les dominés (tableau 4). Les dominants semblent donc plus affectés par le SDR que les dominés. Ce résultat est en accord avec une étude concernant les effets de la défaite sociale chronique sur la susceptibilité au virus de la grippe. Dans cette étude, la mortalité était significativement accrue par le stress. Alors que 48% des dominés

stressés succombaient au virus, les décès atteignaient 86% parmi les dominants (Sheridan *et al.*, 2000).

Tableau 4 : Conséquences endocriniennes et immunitaires de la défaite sociale. Influence des combats et du statut social initial (synthèse des résultats de la thèse).

	Défaite avec combats (SDR)	Défaite avec combats limités (MSS)	Influence du statut social lors de la défaite
Blessures	↗↗	↗	oui
Activité endocrinienne :			
Corticostérone	↗	↗	non
IL-6 plasmatique	↗↗	↗	-
Réactivité inflammatoire :			
Prolifération (stim. LPS)	↗	-	oui
Production d'IL-6 (stim. LPS)	↗	=	non
Sensibilité aux GCs	↘	=	non
Fonctions lymphocytes T :			
Prolifération (stim. Con A)	↘	-	-
Balance Th1 / Th2	=	-	non
Immunité spécifique (stim. tuber.)	=	-	-
Résistance au BCG	=	-	-

Il est connu que, lorsque l'on introduit un intrus dans un groupe de rongeurs, il est très rapidement attaqué par le dominant mais beaucoup moins fréquemment par les dominés (Blanchard *et al.*, 1988; Haemisch *et al.*, 1994). Il est donc possible que pendant les sessions de SDR, les dominants tentent au début de répondre aux attaques de l'intrus et soient de ce fait plus agressés et plus blessés que les dominés. La sévérité des combats, plus forte chez les dominants, pourrait expliquer les différences de conséquences immunitaires entre dominants et dominés. Bartolomucci et al. ont avancé une autre explication (2001). Selon eux, la « signification » de la défaite est beaucoup plus grave pour les dominants, et entraîne de ce fait un stress psychologique supérieur à celui des dominés. Dans leur étude, la procédure d'intrus-résident utilisée permet la formation de quatre catégories d'animaux : les résidents dominants, les résidents dominés, les intrus dominants et les intrus dominés. Résident et intrus sont la majorité du temps séparés par une grille, empêchant ainsi les combats. Seuls les résidents dominés présentent une production altérée de cytokines. Les auteurs suggèrent que le stress psychologique est peut-être plus fort dans cette catégorie d'animaux parce qu'ils sont

les seuls à perdre la possession de leur territoire. De façon similaire, lors du SDR, les dominés subissent un stress important parce qu'ils sont exposés aux attaques de l'intrus, mais le stress n'a pour conséquence finale que de leur imposer un nouveau mâle dominant. En revanche, le dominant subit non seulement les attaques mais il perd aussi sa position de dominant.

Le statut social n'est cependant pas l'unique facteur de l'histoire sociale capable de modifier l'amplitude des effets de la défaite sociale. Ainsi, des individus ayant vécu isolés depuis le sevrage semblent développer une résistance aux glucocorticoïdes plus forte que des animaux logés en groupe. Un stress social récent (formation d'un nouveau groupe une semaine auparavant) semble elle aussi accroître les effets du SDR (Avitsur *et al.*, 2003).

B. Importance de l'état d'activation du système immunitaire

1) Etudes in vivo

Influence d'un challenge inflammatoire antérieur

Un stimulus inflammatoire peut diminuer la libération de cytokines inflammatoires en réponse à un nouveau stress de nature immune. Nagano et al. (1999) ont montré que des injections répétées de LPS diminuent la production ultérieure d'IL-1 et de TNF-α en réponse à une nouvelle injection de LPS. Harbuz et al. (2002) rapportent que l'induction d'une arthrite par l'injection d'adjuvant est diminuée chez des rats ayant subit un challenge au LPS trois semaines auparavant. A notre connaissance, aucune étude n'avait étudié les conséquences d'une activation immune antérieure sur la réponse inflammatoire à un stress psychologique.

L'étude menée au chapitre 6 avait pour objectif de déterminer si un stimulus inflammatoire peut interagir avec la réponse à un stress psychologique ultérieur. Un modèle plus simple que l'interaction BCG - SDR a été utilisé. L'effet d'une injection préalable de LPS a été observé sur des souris exposées à quatre heures de contention. Les résultats montrent que la libération plasmatique d'IL-1β est inhibée par le pré-traitement. Cet effet n'est pas dû à une désensibilisation de l'axe corticotrope par le LPS puisque le prétraitement n'altère pas la réponse de l'ACTH et de la corticostérone à la contention. En revanche, le traitement au LPS ne s'est pas opposé à l'effet du stress sur la production d'IL-6 et d'IL-10 par les splénocytes. Cette étude montre qu'un stimulus inflammatoire peut modifier la réactivité à un stress psychologique. Cependant, cette désensibilisation ne s'exprime pas pour toutes les variables

mesurées. Entre autres, elle montre qu'une réponse inflammatoire systémique ancienne d'une semaine ne désensibilise pas les splénocytes au stress psychologique.

Ce résultat semble contredire l'hypothèse formulée à la fin du chapitre précédent, où il était suggéré que la stimulation des cellules de la rate par le BCG pouvait avoir diminué leur sensibilité aux effets du SDR. Cependant, l'effet du BCG sur les splénocytes est beaucoup plus complexe que celui du LPS. De plus, dans le cas de l'expérience avec BCG, le BCG était encore présent dans la rate au moment du stress, alors que dans le cas de l'étude ci-dessus, les effets du LPS sur la rate étaient déjà atténués par le temps. Afin de préciser les effets du prétraitement au LPS, une étude faisant varier l'intervalle entre le prétraitement et le stress devrait être réalisée.

Influence d'un challenge antigénique antérieur

De façon similaire, très peu de données permettent de déterminer si l'activation préalable des lymphocytes est en mesure de diminuer leur sensibilité ultérieure au stress. La vaccination contre un antigène est un moyen d'activer spécifiquement les lymphocytes spécifiques de cet antigène. L'application quasi-simultanée de chocs électriques inhibe la réponse spécifique à cet antigène (Kusnecov and Rabin, 1993; Moynihan *et al.*, 1990). En revanche, si le stress est appliqué 1 à 5 jours après la vaccination, la réponse spécifique à l'antigène n'est pas supprimée alors que celle à des mitogènes polyclonaux l'est (Kusnecov and Rabin, 1993). Il semble donc que les lymphocytes spécifiques de l'antigène, activés par l'immunisation préalable, soient devenus insensibles au stress alors que les autres lymphocytes soient restés sensibles à l'effet suppressif du stress. Les auteurs de cette étude ont proposé que seuls les lymphocytes naïfs sont sensibles au stress mais pas les cellules mémoires. Or les lymphocytes mémoires peuvent aussi être affectés par le stress puisqu'un stress de contention chronique est capable d'inhiber les lymphocytes T cytotoxiques mémoires dirigés contre un herpes virus chez des souris ayant été vaccinées contre ce virus 4 à 6 semaines auparavant (Wonnacott and Bonneau, 2002).

Finalement, il est possible que le stress soit capable d'affecter à la fois les lymphocytes naïfs et mémoires, mais quand ceux-ci ne sont pas activés. Ceci expliquerait qu'un stress appliqué de façon simultanée avec l'infection, ou lorsque l'infection est dormante soit capable d'inhiber la réponse spécifique contre le pathogène, mais que le stress soit moins efficace sur des lymphocytes effecteurs, déjà engagés dans la réponse contre l'antigène.

2) Etudes in vitro

Un certain nombre d'études *in vitro* viennent appuyer l'hypothèse selon laquelle les glucocorticoïdes ou les catécholamines auraient des effets différents sur les cellules immunitaires selon leur stade de différenciation et leur état d'activation.

L'influence pro-Th2 des « hormones du stress » dépend de l'état de maturation et d'activation des cellules immunitaires

La fonction de présentation de l'antigène par les cellules dendritiques est altérée différemment selon que les glucocorticoïdes sont appliqués à des cellules dendritiques (DC) matures ou immatures. *In vitro,* le traitement de DC avec du LPS permet leur maturation. Elles diminuent alors leur activité de phagocytose et augmentent l'expression de molécules de co-stimulation (B7.1, B7.2 et CD40) et de molécules du CMH II, qui vont permettre une stimulation efficace des lymphocytes auxiliaires (Palucka and Banchereau, 1999). Si l'on expose des DC immatures à un traitement par de la dexaméthasone (DEXA) avant de les stimuler avec du LPS, les cellules obtenues expriment moins de molécules du CMH II et de co-stimulation que les cellules non traitées à la DEXA. Ces cellules induisent une prolifération réduite des lymphocytes T lorsqu'elles leur présentent un antigène. Cette diminution de la prolifération est due à une inhibition de la production de clones de type Th1 mais pas de type Th2. En revanche, si les DC sont traitées par la DEXA après la maturation par le LPS, aucun changement phénotypique ou fonctionnel ne survient (Matyszak *et al.*, 2000). Les glucocorticoïdes ne pourraient donc altérer la fonction des cellules dendritiques qu'en agissant sur les cellules immatures, c'est à dire sur des cellules qui n'ont pas encore été activées par un signal de danger microbien.

Si la sensibilité des DC aux glucocorticoïdes varie de façon similaire *in vivo,* cela pourrait expliquer l'effet particulièrement important du stress sur la réponse primaire à un antigène. En effet, seules les cellules dendritiques sont en mesure d'initier une réponse primaire, alors que les macrophages et les lymphocytes B sont des CPA efficaces lors d'une seconde rencontre avec l'antigène (Palucka and Banchereau, 1999). Si un stress survient juste avant ou au moment d'une primoinfection, les cellules dendritiques sont susceptibles d'être exposées aux glucocorticoïdes circulants avant d'entrer en contact avec le pathogène. Le stress pourrait alors inhiber fortement leur capacité à initier la réponse primaire, mettant en danger la survie de l'organisme. En revanche, si le stress survient après la stimulation des DC par le

pathogène, les glucocorticoïdes ne peuvent plus altérer le fonctionnement des cellules dendritiques. Si le stress survient de façon concomitante à une infection secondaire, même si les cellules dendritiques sont inhibées, les cellules mémoires pourraient être activées par d'autres CPA, ce qui minimiserait les conséquences du stress.

Glucocorticoïdes et catécholamines peuvent encore exercer un effet pro-Th2 en agissant non sur les CPA mais directement sur les lymphocytes. Or l'influence des catécholamines sur les lymphocytes Th dépend de leur stade de différenciation et de leur état d'activation. *In vitro,* la présence de noradrénaline au moment de la présentation antigénique à des lymphocytes T CD4 naïfs génère des cellules Th1 (Swanson *et al.*, 2001). Si les catécholamines sont ajoutées sur des cellules qui viennent de se différencier en Th1 ou Th2, elles n'ont aucun effet (Ramer-Quinn *et al.*, 2000). Sur des cellules Th plus anciennes (présentant probablement un phénotype mémoire), les catécholamines inhibent les clones de type Th1 (Ramer-Quinn *et al.*, 1997). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le stress serait inefficace sur des lymphocytes activés. Cela permettrait d'expliquer pourquoi le SDR n'a pas altéré la balance Th1/Th2 de la réponse anti-BCG dans notre étude, alors que le profil Th des cellules mémoires de souris présentant une infection mycobactérienne dormante peut être affecté par un stress de contention (Howard and Zwilling, 1999).

La sensibilité des macrophages aux catécholamines dépend de leur état d'activation

L'équipe de Zwilling et Lafuse a montré que l'effet des catécholamines sur les macrophages dépend de leur état d'activation. Lorsque des macrophages non activés issus de souris saines sont traités avec des catécholamines puis infectés avec *Mycobacterium Avium,* ils présentent une activité antimicrobienne accrue en produisant plus d'oxyde nitrique et d'ion superoxide que des macrophages non prétraités (Weatherby *et al.*, 2003). Si les macrophages ont été activés préalablement par de l'IFN-γ ou des mycobactéries, l'ajout d'épinéphrine stimule alors la production d'Il-10, inhibe celle de NO, et diminue la capacité des macrophages à tuer les mycobactéries (Boomershine *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Des récepteurs différents sont impliqués dans les deux situations. Dans le cas des macrophages non-activés, l'effet stimulant est permis par les récepteurs α2 (Weatherby *et al.*, 2003). Dans le cas des macrophages déjà activés, la suppression passe par la liaison à des récepteurs adrénergiques β2 (Boomershine *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1999). Ainsi, la présence de catécholamines avant l'infection

bactérienne stimulerait les macrophages, alors qu'une application sur des macrophages déjà activés aurait l'effet inverse.

II. La composante physique du stress social

A. Conséquences immunitaires des stress psychologiques et des stress « mixtes »

1) Importance de la composante physique lors du stress social

Le stress social est un stress de nature mixte. Il comporte une composante psychologique évidente mais aussi une composante physique importante, lié aux combats. Afin de vérifier le rôle des combats dans l'apparition de l'état pro-inflammatoire associé au SDR, nous avons comparé les conséquences de deux stress sociaux, l'un permettant les combats et l'autre les empêchant, créant ainsi deux situations contrastées en termes de blessures ($5^{ème}$ chapitre). Les deux stress utilisés (SDR et MSS) étaient comparables en terme de signification éthologique (une défaite imposée sur le territoire des animaux expérimentaux par un mâle étranger), de durée (deux heures) et de fréquence (six sessions de stress). Par contre, la séparation des résidents de l'intrus par une cage grillagée immédiatement après que l'intrus ait soumis tous les résidents permettait de limiter les combats dans la procédure MSS.

Les conséquences de chacune des procédures sont résumée dans le tableau 4. Les deux procédures ont augmenté les concentrations plasmatiques de la corticostérone et de l'IL-6 après la première session de stress, témoignant d'une réponse de stress dans les deux situations. L'accroissement de la production d'IL-6 par les cellules spléniques et la diminution de leur sensibilité aux glucocorticoïdes ne sont apparus que dans le cas du SDR, alors que le stress où les blessures et l'activité physique liées aux combats étaient limitées (MSS) n'a pas affecté les splénocytes. Les résultats de cette étude montrent que les combats sont nécessaires à l'apparition d'un état pro-inflammatoire lors du stress social.

2) Données de la littérature

Le stress social n'est pas le seul stress utilisé en laboratoire à présenter une composante physique importante. Par exemple, les chocs électriques induisent des brûlures, et le stress d'immobilisation utilisé fréquemment chez le rat implique une fixation rigide des membres et

de la queue. En revanche, l'exposition à un bruit ou une odeur peut être considérée comme un stress purement psychologique. Le stress de contention, qui consiste à laisser l'animal dans un tube qui ne le serre pas mais réduit son activité locomotrice est aussi un stress qui respecte l'intégrité physique de l'animal tant qu'il est suffisamment court.

Les études sur l'importance de la composante physique du stress social étant assez rares, nous avons tenté d'étendre notre recherche à d'autres types de stress. Très peu d'études se sont attachées à dissocier les effets purement psychologiques d'un stress de ceux dus aux atteintes somatiques associées. La comparaison des différents types de stress utilisés dans différentes études suggère qu'un état pro-inflammatoire apparaît généralement suite à des stress « mixtes ». En effet, une session de chocs électriques ou l'immobilisation chronique sont, comme le SDR, en mesure d'accroître la production de cytokines inflammatoires en réponse à une injection de LPS (Johnson *et al.*, 2002; Mekaouche *et al.*, 1994; Moraska *et al.*, 2002; O'Connor *et al.*, 2003). Une contention de quatre heures augmente la production d'IL-6 par les splénocytes stimulés *in vitro* avec du LPS (chapitre 6). En revanche, après un stress de contention de 15 minutes dans un tube, la réponse inflammatoire à une injection de LPS est au contraire diminuée (Goujon *et al.*, 1995).

L'accroissement de la réponse inflammatoire par le stress est parfois associé à une diminution de la sensibilité des cellules immunitaires aux hormones de l'axe corticotrope. Chocs électriques et stress social induisent une résistance aux glucocorticoïdes (O'Connor *et al.*, 2003; Stark *et al.*, 2001). Mais des stress qui n'induisent pas d'atteinte physique ou de douleur comme l'exposition aiguë à du bruit ou de la contention chronique ne modifient pas la sensibilité des cellules spléniques aux glucocorticoïdes (Bauer *et al.*, 2001; Sandi *et al.*, 1992).

Une étude menée chez le rat semble contredire notre hypothèse et laisse penser que les conséquences immunes d'un stress ne diffèrent pas selon que le stress présente ou non une composante physique. Les réponses endocriniennes et immunitaires d'animaux exposés à des chocs électriques et d'animaux exposés à leur odeur mais ne subissant pas les chocs y étaient comparées (Palermo-Neto *et al.*, 2003). L'augmentation de la corticostérone plasmatique était supérieure dans le groupe exposé aux chocs mais les macrophages péritonéaux des deux groupes présentaient des diminutions de l'activité phagocytaire et des augmentations de la production de H_2O_2 comparables. Il est important de noter que les chocs électriques utilisés ici étaient d'une intensité beaucoup plus faible (0.2 mA) que ceux utilisés dans les études citées

précédemment (1.6-1.8 mA). Les brûlures occasionnées par les chocs étaient probablement très superficielles voire inexistantes dans cette étude, minimisant ainsi l'importance de la composante physique.

B. Mécanismes possibles de modulation de la réactivité immunitaire par la composante physique du stress social

Les combats peuvent influencer la réponse au stress de plusieurs façons. D'une part, les atteintse physiques peuvent augmenter le stress psychologique. D'autre part, la composante physique induit des stimuli absents lors d'un stress purement émotionnel. Un stress de nature psychologique ne fait intervenir que des stimuli sensoriels transmis par la vue, l'ouie ou l'odorat. En revanche, les stress comportant une composante physique apportent en plus une composante tactile qui peut être douloureuse. Ils peuvent aussi induire des lésions tissulaires et favoriser l'entrée de microorganismes dans le milieu intérieur, provoquant ainsi une inflammation locale. Enfin, en induisant des réponses de fuite ou de combat, ces facteurs de stress favorisent une activité physique intense. Douleur, inflammation locale et activité physique entraînent des réponses périphériques et centrales spécifiques, pouvant se surajouter à celles liées au stress psychologique. Au cours de cette thèse, nous n'avons pas eu le temps d'étudier l'importance de ces différents facteurs sur la réactivité immunitaire. Nous allons cependant tenter de présenter les différentes voies par lesquelles les combats associés au stress peuvent moduler la réactivité immunitaire.

1) Modulation de l'intensité du stress psychologique

Chez l'homme, un stress physique n'est pas nécessaire pour induire un état pro-inflammatoire. Par exemple, le stress des examens ou le fait de s'occuper d'un proche atteint de démence diminuent la sensibilité des lymphocytes sanguins au cortisol (Bauer *et al.*, 2000; Sauer *et al.*, 1995). Il est donc possible qu'un état de résistance n'apparaisse qu'à partir d'un certain seuil d'intensité du stress psychologique, et que la composante physique n'intervienne qu'en augmentant ce stress psychologique.

Chez l'animal, il est difficile de dissocier la composante émotionnelle de la composante physique du stress, l'une augmentant souvent avec l'autre. Nous ne disposons pas de données concernant le rôle de l'intensité du stress émotionnel dans l'apparition de la résistance aux glucocorticoïdes. En revanche, l'accroissement des effets du stress quand l'intensité et la

durée du stress augmentent a été montré sur d'autres variables immunitaires. Ainsi, la suppression de la prolifération lymphocytaire par les chocs électriques ou l'immobilisation augmente avec le nombre de chocs ou avec la durée de la contention (Rinner *et al.*, 1992; Shurin *et al.*, 1994). L'étude menée au chapitre 5 montre que les animaux du groupe MSS ne présentaient pas de résistance aux glucocorticoïdes. En parallèle, ces animaux présentaient une réponse de l'IL-6 plasmatique plus faible que celle des animaux du groupe SDR, suggérant que l'intensité du stress perçu était plus faible que dans le groupe SDR. Il est donc possible que la diminution de sensibilité aux glucocorticoïdes soit induite par un stress psychologique d'intensité particulièrement forte, tel que le SDR, mais n'apparaisse pas lorsque l'intensité est plus faible, par exemple quand l'animal est menacé à distance mais ne subit pas les attaques de l'intrus.

2) Importance de l'activité physique

Différents marqueurs sanguins ont été comparés chez le rat après une session de chocs électriques, de nage forcée ou de course volontaire dans une roue (Abel, 1994). Lactate et glucose sanguins se trouvent augmentés et la teneur en CO_2 est diminuée dans les trois cas. Seule l'amplitude des réponses varie légèrement d'un groupe à l'autre, indiquant que les chocs électriques ou la nage forcée induisent des modifications métaboliques liées à une activité physique. Or le rôle de l'activité physique dans les répercussions immunitaires du stress est généralement ignoré.

Ceci est une erreur car l'activité physique est en mesure d'agir sur les mêmes variables immunitaires que le stress. Des rats disposant d'une roue dans leur cage depuis huit semaines présentent une diminution de la prolifération des lymphocytes mésentériques, une diminution de la production d'IgM en réponse à une immunisation, et une production accrue de NO par les splénocytes (Moraska *et al.*, 2000). De plus, il devient de plus en plus évident que les effets de l'activité physique peuvent interagir avec la réactivité au stress. Ainsi, chez le rat, l'activité physique régulière empêche la suppression par les chocs électriques de l'activité cytotoxique des cellules NK et de la réponse humorale à une vaccination (Avula *et al.*, 2001; Moraska and Fleshner, 2001).

Chez la souris Balb/c, l'activité physique permise par la présence d'une roue pendant huit semaines augmente la capacité des macrophages péritonéaux à produire de l'IL-1 en réponse à une stimulation au LPS, stimule la prolifération des splénocytes en réponse à la concanavaline

A, accroît leur production d'IL-2 mais n'affecte pas celle d'IL-4 (Sugiura *et al.*, 2002). L'activité physique chronique chez la souris permettrait donc d'augmenter la production de cytokines Th1 ou pro-inflammatoires au dépend des cytokines Th2. La chronicité de l'exercice ne semble pas nécessaire pour induire un état pro-inflammatoire puisque chez l'homme, un exercice physique bref augmente la production *in vitro* d'IL-1 et d'IFN-γ et n'affecte pas celle d'IL-4 par les cellules sanguines après stimulation à la concanavaline A (Moyna *et al.*, 1996). Il est donc possible que l'activité musculaire fournie par les animaux lors des combats soit pour partie responsable des effets pro-inflammatoires du stress.

3) Importance des blessures

Un autre facteur important, mais cette fois-ci plus particulier au stress social, est la présence de blessures. Les blessures pourraient favoriser l'effet pro-inflammatoire du stress. En effet, de Groot et al (2002) ont rapporté que le stress social déséquilibrait la production de cytokines en diminuant la production d'IL-4 et d'IL-10 sans altérer celle d'IFN-γ et d'IL-2 uniquement chez les animaux blessés. Les animaux intacts ne différaient pas des témoins. Dans une étude utilisant le SDR, il a été montré que la résistance aux glucocorticoïdes ne survenait que chez les animaux blessés (Avitsur *et al.*, 2001). Cependant, dans ces études, les blessures étaient observées à posteriori et un lien de causalité entre la présence de blessures et l'apparition de la résistance ne peut être établi avec certitude.

Les blessures pourraient influencer la réponse au stress soit en augmentant le stress psychologique, soit en induisant une activation directe du système immunitaire au niveau des blessures cutanées. Le fait que nous n'ayons pas retrouvé d'IL-6 plasmatique au lendemain de la dernière session de SDR suggère que la réponse inflammatoire induite au niveau des blessures reste relativement localisée. Mais un faible nombre de bactéries pourrait peut-être passer dans la circulation sanguine, pour être finalement « filtré » et retenu au niveau de la rate. Or un pré-traitement avec de très faibles doses de LPS est capable de potentialiser fortement la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages en réponse à un second challenge au LPS (Hirohashi and Morrison, 1996). Ainsi, le passage de quelques bactéries via les blessures pourrait jouer un rôle dans la potentialisation de la réactivité inflammatoire lors du SDR.

Conclusion

Ces travaux de thèse nous ont permis de montrer que l'environnement social modifie la réponse immunitaire. En conditions stables, il influence la réactivité des systèmes neuroendocrinien et immunitaire au travers du statut social. En conditions d'instabilité sociale, il est source de stress et affecte l'immunité. De plus, nous avons vu que la réponse à un stress social est modulée par le statut social de l'animal déterminé avant la survenue du stress.

Nous avons aussi mis en évidence l'influence de facteurs peu étudiés jusqu'ici qui modulent la façon dont l'organisme répond aux stimulations de l'environnement. Ces facteurs sont liés d'une part à l'histoire de l'individu, d'autre part à la nature du facteur de stress. D'après nos travaux, l'histoire individuelle récente est capable de modifier la réactivité comportementale (selon son statut social, un individu attirera plus ou moins les attaques de l'intrus) ou immunitaire (un épisode inflammatoire récent modifie la réponse inflammatoire systémique à un stress de contention). Nous avons aussi montré l'importance d'une caractéristique propre au facteur de stress, généralement ignorée dans les études traitant des conséquences physiologiques du stress, qui est la composante physique associée au stress (un stress social sans combats ni blessures n'augmente pas la réactivité inflammatoire des splénocytes).

Les données de la littérature indiquent que le stress peut faire pencher la balance Th1/Th2 vers un profil Th2 et peut avoir un effet pro-inflammatoire. Dans le cas du stress social, nous avons montré que seul l'effet pro-inflammatoire s'exprimait. Cela suggère que les effets pro-inflammatoires et pro-Th2 du stress ne vont pas nécessairement de paire. La compréhension des conséquences immunitaires du stress serait probablement améliorée si l'on comprenait quelles sont les caractéristiques des facteurs de stress responsables de l'un ou l'autre de ces effets. Cela impliquerait de proposer une classification des facteurs de stress selon un certain nombre de critères qu'il faudra définir. Le critère « temps » est utilisé de longue date (notion de stress aigu ou chronique). Nous avons montré que, dans le cadre du stress social, la composante physique est fondamentale dans l'apparition des altérations immunitaires. Il serait pertinent d'approfondir l'étude de l'influence de la composante physique du stress, afin de déterminer si son influence sur l'immunité est généralisable à d'autres facteurs de stress. Il est possible que la composante physique ne joue un rôle que parce qu'elle augmente l'intensité du stress psychologique. Durant cette thèse, nous avons montré que l'utilisation des concentrations plasmatiques de glucocorticoïdes n'est pas toujours suffisante pour différencier des stress d'intensité vraisemblablement différente. Il faudrait donc définir des marqueurs

physiologiques ou comportementaux permettant de mesurer plus précisément ce critère « intensité » et de déterminer le seuil d'intensité conduisant à des répercussions immunitaires. Enfin, des études mécanistiques pourraient peut-être aider à déterminer si l'activation préférentielle de tel ou tel système neuroendocrinien (par exemple le système sympathique) est responsable de tel ou tel effet du stress (par exemple un profil pro-inflammatoire). Il fut un temps où les facteurs de stress étaient décrits comme stress à dominante sympathique ou à dominante corticotrope. Cette classification a été délaissée ces dernières années sans que l'on ait réellement exploré si elle pouvait être pertinente en termes de répercussions immunitaires. Or, il est probable que l'effet pro-inflammatoire du stress soit plutôt dû aux catécholamines (ou à d'autres neuromédiateurs moins étudiés tels que le CRH, le peptide intestinal vasoactif VIP…) qu'aux glucocorticoïdes.

Ces travaux nous ont aussi conduit à plusieurs conclusions et perspectives de recherche en matière de gestion des répercussions immunitaires du stress chez l'animal. Une première attitude à adopter est certainement de type préventif. Cette prévention peut-être faite au niveau des facteurs de stress. La classification des stress selon des critères déterminés comme ci-dessus permettrait de déterminer, dans chaque situation de stress rencontrée en élevage, sur quelles caractéristiques du stress agir pour minimiser les répercussions immunitaires. Par exemple, nous avons vu que chez la souris les répercussions immunitaires d'un stress social, même répété, sont minimisées si la composante physique introduite par les combats est limitée. S'il en va de même chez le porc, différentes méthodes de regroupement pourraient être testées (en jouant sur le poids, le sexe, le nombre total d'individus, le moment du regroupement, le nombre de groupes d'origine réunis, la compartimentation de la loge, etc) en utilisant la fréquence des combats comme critère de sélection. Le problème de cette approche est qu'elle reste ponctuelle et doit être recommencée pour chaque facteur de stress étudié.

La prévention peut aussi être faite au niveau de l'animal, en minimisant sa réactivité émotionnelle au stress. Certains événements précoces dans la vie de l'animal, comme un stress survenant dans la période périnatale, peuvent accroître la réactivité ultérieure au stress. Une attention particulière pourrait être portée aux conditions de gestation puis d'élevage du jeune, afin de minimiser la susceptibilité au stress à l'âge adulte. Il est aussi possible d'influencer la réactivité de l'animal en jouant sur son environnement. Durant cette thèse, nous avons pu voir que même si les conditions de logement (ici les conditions sociales) n'induisent pas une situation qualifiable de « stressante » (il est difficile de dire si, des

dominants et des dominés, une catégorie est plus stressée que l'autre), elles modifient le fonctionnement des systèmes neuroendocrinien et immunitaire. Ceci montre que pour améliorer le bien-être animal, il est bien sûr important de s'intéresser aux situations de stress aigu rencontrées en élevage, mais aussi à l'environnement (physique et social) dans lequel l'animal évolue tous les jours. Les recherches menées à ce sujet dans les espèces d'intérêt agronomique se sont surtout penchées sur des critères tels que la taille de l'espace alloué et le type de sol proposé. L'effet de l'apport de litière a été largement étudié chez le porc, d'autres facteurs environnementaux ont peut-être été négligés. Par exemple, l'environnement social chez le jeune est un facteur important. On sait actuellement que l'élevage des porcelets en box de maternité conventionnel conduit à des combats plus violents lors d'un regroupement à l'âge adulte que l'élevage dans une salle de maternité où plusieurs truies évoluent en liberté avec leurs porcelets.

Une seconde possibilité consiste à rechercher des traitements minimisant les répercussions immunitaires du stress. Ici encore, une approche pharmacologique serait nécessaire pour savoir quelles hormones ou neuromédiateurs sont impliqués dans les manifestations que l'on souhaite éviter. L'utilisation de traitements pharmacologiques en élevage a été explorée dans les années quatre-vingt. Cette approche est peu satisfaisante parce qu'elle est coûteuse et pose des problèmes d'acceptabilité par le consommateur. Une autre approche concerne le domaine de l'immunomodulation. Certains facteurs nutritionnels sont soupçonnés de moduler l'activité du système nerveux central (tryptophane et voie de la sérotonine) ou du système immunitaire (acides gras polyinsaturés ω3 et inflammation). L'efficacité d'une supplémentation de l'alimentation en éléments nutritionnels immunomodulateurs aux périodes critiques de la vie d'un animal d'élevage est un champ de recherche quasiment inexploré.

Bibliographie

Abbott, D. H., Keverne, E. B., Bercovitch, F. B., Shively, C. A., Mendoza, S. P., Saltzman, W., Snowdon, C. T., Ziegler, T. E., Banjevic, M., Garland, T. and Sapolsky, R. M. Are subordinates always stressed? A comparative analysis of rank differences in cortisol levels among primates. *Hormones and Behavior*, 2003, 43, 67-82.

Abel, E. L. Physical activity does not account for the physiological response to forced swim testing. *Physiology and Behavior*, 1994, 56, 677-681.

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

Ando, T., Brown, R. F., Berg, R. D. and Dunn, A. J. Bacterial translocation can increase plasma corticosterone and brain catecholamine and indoleamine metabolism. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 279, R2164-R2172.

Aubert, A. Emotionality, cognition, and social status in house mice. *Advances in Ethology*, 2001, 36, 117.

Avitsur, R., Stark, J. L., Dhabhar, F. S., Kramer, K. A. and Sheridan, J. F. Social experience alters the response to social stress in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2003.

Avitsur, R., Stark, J. L., Dhabhar, F. S., Padgett, D. A. and Sheridan, J. F. Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. *Journal of Neuroimmunology*, 2002a, 124, 54-61.

Avitsur, R., Stark, J. L., Dhabhar, F. S. and Sheridan, J. F. Social stress alters splenocyte phenotype and function. *Journal of Neuroimmunology*, 2002b, 132, 66-71.

Avitsur, R., Stark, J. L. and Sheridan, J. F. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Hormones and Behavior*, 2001, 39, 247-257.

Avula, C. P., Muthukumar, A. R., Zaman, K., McCarter, R. and Fernandes, G. Inhibitory effects of voluntary wheel exercise on apoptosis in splenic lymphocyte subsets of C57BL/6 mice. *Journal of Applied Physiology*, 2001, 91, 2546-2552.

%

Barnard, C. J. and Luo, N. Acquisition of dominance status affects maze learning in mice. *Behavioural Processes*, 2002, 60, 53-59.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Gaspani, L., Limiroli, E., Panerai, A. E., Ceresini, G., Poli, M. D. and Parmigiani, S. Social status in mice: behavioral, endocrine and immune changes are context dependant. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 401-410.

Bartolomucci, A., Palanza, P., Sacerdote, P., Ceresini, G., Chirieleison, A., Panerai, A. E. and Parmigiani, S. Individual housing induces altered immuno-endocrine responses to psychological stress in male mice. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, 28, 540-558.

Bauer, M. E., Perks, P., Lightman, S. and Shanks, N. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 525-532.

Bauer, M. E., Vedhara, K., Perks, P., Wilcock, G. K., Lightman, S. and Shanks, N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 103, 84-92.

Benus, R. F., Bohus, B., Koolhaas, J. M. and van Oortmerssen, G. A. Heritable variation for aggression as a reflection of individual coping strategies. *Experientia*, 1991, 47, 1008-1019.

Besedovsky, H. O. and Del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 1996, 17, 64-102.

Bierhaus, A., Wolf, J., Andrassy, M., Rohleder, N., Humpert, P. M., Petrov, D., Ferstl, R., von Eynatten, M., Wendt, T., Rudofsky, G., Joswig, M., Morcos, M., Schwaninger, M., McEwen, B. S., Kirschbaum, C. and Nawroth, P. P. A mechanism converting

psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100, 1920-1925.

Blalock, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews*, 1989, 69, 1-32.

Blanchard, R. J., Hori, K., Tom, P. and Blanchard, D. C. Social dominance and individual aggressiveness. *Aggressive Behavior*, 1988, 14, 195-203.

Blecha, F., Pollmann, D. S. and Nichols, D. A. Immunologic reactions of pigs regrouped at or near weaning. *American Journal of Veterinary Research*, 1985, 46, 1934-1937.

Bohus, B. and Koolhaas, J. M. 1991. Psychoimmunology of social factors in rodents and other subprimate vertebrates. In *Psychoneuroimmunology* (ed. R. Ader, D. L. Felten and N. Cohen), pp. 807-830. Academic Press, San Diego.

Bohus, B., Koolhaas, J. M., Heijnen, C. J. and de Boer, O. Immunological responses to social stress: dependence on social environment and coping abilities. *Neuropsychobiology*, 1993, 28, 95-99.

Bonneau, R. H., Sheridan, J. F., Feng, N. and Glaser, R. Stress-induced modulation of the primary cellular immune response to herpes simplex virus infection is mediated by both adrenal-dependent and independent mechanisms. *Journal of Neuroimmunology*, 1993, 42, 167-176.

Bonneau, R. H., Zimmerman, K. M., Ikeda, S. C. and Jones, B. C. Differential effects of stress-induced adrenal function on components of the herpes simplex virus-specific memory cytotoxic T-lymphocyte response. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 82, 191-199.

Boomershine, C. S., Lafuse, W. and Zwilling, B. S. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits nitric oxide generation by Mycobacterium avium infected macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 101, 68-75.

Braastad, B. O. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 1998, 61, 159-180.

Brenner, G. J. and Moynihan, J. A. Stressor-induced alterations in immune response and viral clearance following infection with herpes simplex virus-type 1 in BALB/c and C57B1/6 mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1997, 11, 9-23.

Broug-Holub, E., Persoons, J. H. A., Schornagel, K., Mastbergen, S. C. and Kraal, G. Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1998, 19, 842-848.

Brown, D. H., Lafuse, W. and Zwilling, B. S. Cytokine-mediated activation of macrophages from Mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice: differential effects of corticosterone on antimycobacterial activity and expression of the Bcg gene (Candidate Nramp). *Infection and Immunity*, 1995a, 63, 2983-2988.

Brown, D. H., Miles, B. A. and Zwilling, B. S. Growth of Mycobacterium tuberculosis in BCG-resistant and -susceptible mice: establishment of latency and reactivation. *Infection and Immunity*, 1995b, 63, 2243-2247.

Brown, D. H., Sheridan, J. F., Pearl, D. and Zwilling, B. S. Regulation of mycobacterial growth by the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: differential responses of Mycobacterium bovis BCG-resistant and -susceptible mice. *Infection and Immunity*, 1993, 61, 4793-4800.

Brown, D. H. and Zwilling, B. S. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis differentially affects the anti-mycobacterial activity of macrophages from BCG-resistant and susceptible mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1994, 53, 181-187.

Burgat, F. 2001. *Les Animaux D'Élevage Ont-Ils Droit Au Bien-Être?* INRA éditions, Paris.

&

Cacho, R., Fano, E., Areso, P., Garmendia, L., Vegas, O., Brain, P. F. and Azpíroz, A. Endocrine and lymphoproliferative response changes produced by social stress in mice. *Physiology and Behavior*, 2003, 78, 505-512.

Campisi, J., Hansen, M. K., O'Connor, K. A., Biedenkapp, J. C., Watkins, L. R., Maier, S. F. and Fleshner, M. Circulating cytokines and endotoxines are not necessary for the

activation of the sickness or corticosterone response produced by peripheral E.Coli challenge. *Journal of Applied Physiology*, 2003, 18.

Campisi, J., Leem, T. H. and Fleshner, M. Acute stress decreases inflammation at the site of infection. A role for nitric oxide. *Physiology and Behavior*, 2002, 77, 291-299.

Cao, L., Filipov, N. and Lawrence, D. A. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to Listeria monocytogenes. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 125, 94-102.

Cavaillon, J. -M. Inflammation d'origine bactérienne. *Revue française d'Allergologie*, 1996, 36, 914-924.

Chen, L., Boomershine, C. S., Wang, T., Lafuse, W. and Zwilling, B. S. Synergistic interaction of catecholamine hormones and Mycobacterium avium results in the induction of interleukin-10 mRNA expression by murine peritoneal macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 93, 149-155.

Cocke, R., Moynihan, J. A., Cohen, N., Grota, L. J. and Ader, R. Exposure to conspecific alarm chemosignals alters immune responses in BALB/c mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1993, 7, 36-46.

Comoy, E. E., Capron, A. and Thyphronitis, G. In vivo induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *International Immunology*, 1997, 9, 523-531.

Consoli, S. M. Stress et appareil cardiovasculaire. *Encéphale*, 1993, 19, 29-36.

Coussons-Read, M. E., Maslonek, K. A., Fecho, K., Perez, L. and Lysle, D. T. Evidence for the involvement of macrophage-derived nitric oxide in the modulation of immune status by a conditioned aversive stimulus. *Journal of Neuroimmunology*, 1994, 50, 51-58.

Creel, S. Social dominance and stress hormones. *TRENDS in Ecology & Evolution*, 2001, 16, 491-497.

Cunnick, J. E., Lysle, D. T., Kucinski, B. J. and Rabin, B. S. Evidence that shock-induced immune suppression is mediated by adrenal hormones and peripheral beta-adrenergic receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 1990, 36, 645-651.

Dantzer, R. & Mormède, P. 1979. *Le Stress En Élevage Intensif*. Masson, Paris.

Daynes, R. A. and Araneo, B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. *European Journal of Immunology*, 1989, 19, 2319-2325.

de Boer, O., Van der Gugten, J. and Slangen, J. L. Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiology and Behavior*, 1989, 45, 789-795.

De Castro, C. M. M. B., Manhaes de Castro, R., Fernandes de Medeiros, A., Queirós santos, A., Ferreiera e Silva, T. and Luis de Lima Filho, J. Effect of stress on the production of O(2)(-) in alveolar macrophages. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 108, 68-72.

de Groot, J., Boersma, W. J. A., Scholten, J. W. and Koolhaas, J. M. Social stress in male mice impairs long-term antiviral immunity selectively in wounded subjects. *Physiology and Behavior*, 2002, 75, 277-285.

de Groot, J., Ruis, M. A. W., Scholten, J. W., Koolhaas, J. M. and Boersma, W. J. A. Long-term effects of social stress on antiviral immunity in pigs. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 145-158.

de Groot, J., van Milligen, F. J., Moonen-Leusen, G. T., Thomas, G. and Koolhaas, J. M. A single social defeat transiently suppresses the anti-viral immune response in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 95, 143-151.

de Jong, I. C., Sgoifo, A., Lambooij, E., Korte, S. M., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M. Effects of social stress on heart and heart rate variability in growing pigs. *Canadian Journal of Animal Sciences*, 2001, 80, 273-280.

Deak, T., Meriwether, J. L., Fleshner, M., Spencer, R. L., Abouhamze, A., Moldawer, L. L., Grahn, R. E., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Evidence that brief stress may induce the

acute phase response in rats. *American Journal of Physiology*, 1997, 273, R1998-R2004.

Deak, T., Nguyen, K. T., Fleshner, M., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Acute stress may facilitate recovery from a subcutaneous bacterial challenge. *Neuroimmunomodulation*, 1999, 6, 344-354.

Deguchi, E. and Akuzawa, M. Effects of Fighting after Grouping on Plasma Cortisol Concentration and Lymphocyte Blastogenesis of Peripheral Blood Mononuclear Cells Induced by Mitogens in Piglets. The *Journal of Veterinary Medical Science*, 1998, 60, 149-153.

DeKruyff, R. H., Fang, Y. and Umetsu, D. T. Corticosteroids enhance the capacity of macrophages to induce Th2 cytokine synthesis in CD4+ lymphocytes by inhibiting IL-12 production. *The Journal of Immunology*, 1998, 160, 2231-2237.

Delrue-Perollet, C., Li, K.-S., Vitiello, S. and Neveu, P. J. Peripheral catecholamines are involved in the neuroendocrine and immune effects of LPS. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1995, 9, 149-162.

Derijk, R., Petrides, J., Deuster, P., Gold, P. W. and Sternberg, E. M. Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans. The *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1996, 81, 228-235.

Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Annals of the New- York Acadademy of Sciences*, 1998, 840, 359-372.

Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 1999, 96, 1059-1064.

Dhabhar, F. S. and McEwen, B. S. Bidirectional effects of stress and glucocorticoid hormones on immune function: possible explanations for paradoxical observations. In *Psychoneuroimmunology*, ed. R. Ader, D. L. Felten and N. Cohen, Academic Press, New York, 2001, pp. 301-338.

Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. and Spencer, R. L. Effect of stress on immune cell distribution, Dynamics and homnonal mechanisms. *The Journal of Immunology*, 1995, 154, 5511-5527.

Dhabhar, F. S., Satoskar, A. R., Bluethmann, H., David, J. R. and McEwen, B. S. Stress-induced enhancement of skin immune function: A role for gamma interferon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 2000, 97, 2846-2851.

Dobbs, C., Feng, N., Beck, F. M. and Sheridan, J. F. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. *The Journal of Immunology*, 1996, 157, 1872-1877.

Dorshkind, K. and Horseman, N. D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *Bioessays*, 2001, 23, 288-294.

Drenth, J. P., Van Uum, S. H., Van Deuren, M., Pesman, G. J., Van der Ven-Jongekrijg, J. and Van der Meer, J. W. M. Endurance run increases circulating IL-6 and IL-1ra but downregulates ex vivo TNF-alpha and IL-1 beta production. *Journal of Applied Physiology*, 1995, 79, 1497-1503.

Drews, C. The concept of dominance and definition of dominance in animal behaviour. *Behaviour*, 1993, 125, 283-313.

Dréau, D., Sonnenfeld, G., Fowler, N., Morton, D. S. and Lyte, M. Effects of social conflict on immune responses and E. coli growth within closed chambers in mice. *Physiology and Behavior*, 1999, 67, 133-140.

(

Ebbesen, P., Villadsen, J. A., Villadsen, H. D. and Heller, K. E. Effect of subordinance, lack of social hierarchy, and restricted feeding on murine survival and virus leukemia. *Experimental Gerontology*, 1991, 26, 479-486.

Elenkov, I. J. Systemic stress-induced Th2 shift and its clinical implications. *International Review of Neurobiology*, 2002, 52, 163-186.

Elenkov, I. J. and Chrousos, G. P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 1999, 10, 359-368.

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

Ely, D. L. and Henry, J. P. Neuroendocrine response patterns in dominant and subordinate mice. *Hormones and Behavior*, 1978, 10, 156-169.

⟫

Fano, E., Sánchez-MartÍn, J. R., Arregi, A., Castro, B., Alonso, A., Brain, P. and Azpíroz, A. Social stress paradigms in male mice: variations in behavior, stress and immunology. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 165-173.

Fauman, M. A. The relation of dominant and submissive behavior to the humoral immune response in balb/c mice. *Biological Psychiatry*, 1987, 22, 771-776.

Febbraio, M. A. and Pedersen, B. K. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J*, 2002, 16, 1335-1347.

Felten, S. Y. and Felten, D. L. 1991. Innervation of lymphoid tissue. In *Psychoneuroimmunology* (ed. R. Ader, D. L. Felten and N. Cohen), pp. 27-69. Academic Press, San Diego, California.

Flesch, I. E. and Kaufmann, S. H. E. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. *Infection and Immunity*, 1991, 59, 3213-3218.

Fleshner, M., Bellgrau, D., Watkins, L. R., Laudenslager, M. L. and Maier, S. F. Stress-induced reduction in the rat mixed lymphocyte reaction is due to macrophages and not to changes in T cell phenotypes. *Journal of Neuroimmunology*, 1995a, 56, 45-52.

Fleshner, M., Brennam, F. X., Nguyen, K. T., Watkins, L. R. and Maier, S. F. RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *American Journal of Physiol*, 1996, 271, R1344-R1352.

Fleshner, M., Hermann, J., Lockwood, L. L., Laudenslager, M. L., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Stressed rats fail to expand the CD45RC+CD4+ (Th1-like) T cell subset in response to KLH: possible involvement of IFN-gamma. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1995b, 9, 101-112.

Fleshner, M., Nguyen, K. T., Cotter, C. S., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Acute stressor exposure both suppresses acquired immunity and potentiates innate immunity. *American Journal of Physiology*, 1998, 275, R870-R878.

Flint, M. S., Valosen, J. M., Johnson, E. A., Miller, D. B. and Tinkle, S. S. Restraint stress applied prior to chemical sensitization modulates the development of allergic contact dermatitis differently than restraint prior to challenge. *Journal of Neuroimmunology*, 2001, 113, 72-80.

Flynn, JA. L. and Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*, 2001, 19, 93-129.

Fokkema, D. S., Koolhaas, J. M. and Van der Gugten, J. Individual characteristics of behavior, blood pressure, and adrenal hormones in colony rats. *Physiology and Behavior*, 1995, 57, 857-862.

Fokkema, D. S., Smith, R. S., Van der Gugten, J. and Koolhaas, J. M. A coherent pattern among social behavior, blood pressure, corticosterone and catecholamine measures in individual male rats. *Physiology and Behavior*, 1988, 42, 485-489.

Fonseca, E. S. M., Massoco, C. O. and Palermo-Neto, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiology and Behavior*, 2002, 77, 205-215.

Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Miailhe, A.-C. and Turcotte, R. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of Mycobacterium bovis BCG. *Infection and Immunity*, 1981, 32, 42-47.

Frost, R. A., Nystrom, G. J. and Lang, C. H. Lipopolysaccharide regulates proinflammatory cytokine expression in mouse myoblasts and skeletal muscle. *American Journal of Physiolology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2002, 283, R698-R709.

Fujiwara, R. and Orita, K. The enhancement of the immune response by pain stimulation in mice. I. The enhancement effect on PFC production via sympathetic nervous system in vivo and in vitro. *The Journal of Immunology*, 1987, 138, 3699-3703.

Fultz, M. J., Barber, S. A., Dieffenbach, C. W. and Vogel, S. N. Induction of IFN-gamma in macrophages by lipopolysaccharide. *International Immunol*, 1993, 5, 1383-92.

✲

Gerosa, F., baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. and Trinchieri, G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 2002, 195, 327-333.

Geverink, N. A., Schouten, W. G. P., Gort, G. and Wiegant, V. M. Individual differences in behavioral and physiological responses to restraint stress in pigs. *Physiology and Behavior*, 2002, 77, 451-457.

Gornikiewicz, A., Sautner, T., Brostjan, C., Schmierer, B., Függer, R., Roth, E., Mühlbacher, F. and Bergmann, M. Catecholamines up-regulate lipopolysaccharide-induced IL-6 production in human microvascular endothelial cells. *FASEB J*, 2000, 14, 1093-1100.

Goujon, E., Parnet, P., Layé, S., Combe, C., Kelley, K. W. and Dantzer, R. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1995, 9, 292-303.

Grimm, M. S., Emerman, J. T. and Weinberg, J. Effects of social housing condition and behavior on growth of the Shionogi mouse mammary carcinoma. *Physiology and Behavior*, 1996, 59, 633-642.

Gruenheid, S. and Gros, P. Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport. *Current Opinion in Microbiology*, 2000, 3, 43-48.

✠

Haemisch, A., Voss, T. and Gärtner, K. Effects of environmental enrichment on aggressive behavior, dominance hierarchies, and endocrine states in male DBA/2J mice. *Physiology and Behavior*, 1994, 56, 1041-1048.

Hale, K. D., Ghanta, V. K., Gauthier, D. K. and Hiramoto, R. N. Effects of rotational stress of different duration on NK cell activity, proinflammatory cytokines, and POMC-derived peptides in mice. *Neuroimmunomodulation*, 2001, 9, 34-40.

Hale, K. D., Weigent, D. A., Gauthier, D. K., Hiramoto, R. N. and Ghanta, V. K. Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sciences*, 2003, 72, 1495-1508.

Harbuz, M. S., Chover-Gonzalez, A., Gibert-Rahola, J. and Jessop, D. S. Protective effect of prior acute immune challenge, but not footshock, on inflammation in the rat. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002, 16, 439-449.

Hardy, C.-A., Quay, J., Livnat, S. and Ader, R. Altered T-lymphocyte response following aggressive encounters in mice. *Physiology and Behavior*, 1990, 47, 1245-1251.

Hart, A. and Kamm, M. A. Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 16, 2017-2028.

Hashimoto, M., Watanabe, T., Fujioka, T., Tan, N., Yamashita, H. and Nakamura, S. Modulating effects of prenatal stress on hyperthermia induced in adult rat offspring by restraint or LPS-induced stress. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 125-132.

Hermann, G., Beck, F. M. and Sheridan, J. F. Stress-induced glucocorticoid response modulates mononuclear cell trafficking during an experimental influenza viral infection. *Journal of Neuroimmunology*, 1995, 56, 179-186.

Hermann, G., Tovar, C. A., Beck, F. M., Allen, C. and Sheridan, J. F. Restraint stress differentially affects the pathogenesis of an experimental influenza viral infection in three inbred strains of mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1993, 47, 83-94.

Herring, A. C., Lee, J., McDonald, R. A., Toews, G. B. and Huffnagle, G. B. Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary Cryptococcus neoformans infection. *Infection and Immunity*, 2002, 70, 2959-2964.

Hessing, M. J. C., Coenen, G. J., Vaiman, M. and Renard, C. Individual differences in cell-mediated and humoral immunity in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, 45, 97-113.

Hessing, M. J. C., Hagelsø, A. M., van Beek, J. A. M., Wiepkema, P. R., Schouten, W. G. P. and Krukow, R. Individual behavioral characteristics in pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 1993, 37, 285-295.

Hessing, M. J. C., Scheepens, C. J. M., Schouten, W. G. P., Tielen, M. J. M. and Wiepkema, P. R. Social rank and disease susceptibility in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1994, 43, 373-387.

Hirohashi, N. and Morrison, D. Low-dose lipopolysaccharide (LPS) pretreatment of mouse macrophages modulates LPS-dependent interleukin-6 production in vitro. *Infection and Immunity*, 1996, 64, 1011-1015.

Hosoi, J., Tsuchiya, T., Denda, M., Ashida, Y., Takashima, A., Granstein, R. D. and Koyama, J. Modification of LC phenotype and suppression of contact hypersensitivity response by stress. *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*, 1998, 3, 79-84.

Howard, A. D. and Zwilling, B. S. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clinical and Experimental Immunology*, 1999, 115, 428-434.

Huang, M., Pang, X., Karalis, K. and Theoharides, T. C. Stress-induced interleukin-6 release in mice is mast cell-dependent and more pronounced in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovascular Research*, 2003, 59, 241-249.

Huygen, K., Abramowicz, D., Vandenbussche, P., Jacobs, F., De Bruyn, J., Kentos, A., Drowart, A., Van Vooren, J.-P. and Goldman, M. Spleen cell cytokine secretion in Mycobacterium bovis BCG-infected mice. *Infection and Immunity*, 1992, 60, 2880-2886.

Iwakabe, K., Shimada, M., Ohta, A., Yahata, T., Ohmi, Y., Habu, S. and Nishimura, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. *Immunology Letters*, 1998, 62, 39-43.

Jalkanen, S. and Salmi, M. Lymphocytes: recirculation. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, 1-7.

Jiang, C. G., Morrow-Tesch, J. L., Beller, D. I., Levy, E. M. and Black, P. H. Immunosuppression in mice induced by cold water stress. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4, 278-291.

Johnson, J. D., O'Connor, K. A., Deak, T., Stark, M., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Prior stressor exposure sensitizes LPS-induced cytokine production. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002, 16, 461-476.

Jung, B. D., Kimura, K., Kitamura, H., Makondo, K., Kanehira, K. and Saito, M. Sympathetic activation of hepatic and splenic IL-1beta mRNA expression during oscillation stress in the rat. *Journal of Veterinary and Medical Sciences*, 1999, 62, 409-413.

Kam, J. C., Szefler, S. J., Surs, W., Sher, E. R. and Leung, D. Y. M. Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *The Journal of Immunology*, 1993, 151, 3460-3466.

Kambayashi, T., Assarsson, E., Lukacher, A. E., Ljunggren, H. G. and Jensen, P. E. Memory CD8+ T cells provide an early source of IFN-gamma. *The Journal of Immunology*, 2003, 170, 2399-2408.

Kawaguchi, Y., Okada, T., Konishi, H., Fujino, M., Asai, J. and Ito, M. Reduction of the DTH response is related to morphological changes of Langerhans cells in mice exposed to acute immobilization stress. *Clinical and Experimental Immunology*, 1997, 109, 397-401.

Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T. and Weinstock, M. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiology and Behavior*, 1998, 63, 397-402.

Keeney, A. J., Hogg, S. and Marsden, C. A. Alterations in core body temperature, locomotor activity, and corticosterone following acute and repeated social defeat of male NMRI mice. *Physiology and Behavior*, 2001, 74, 177-184.

Kitamura, H., Konno, A., Morimatsu, M., Jung, B. D., Kimura, K. and Saito, M. Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 238, 707-711.

Klein, F., Lemaire, V., Sandi, C., Vitiello, S., Van der Logt, J., Laurent, P. E., Neveu, P. J., Le Moal, M. and Mormède, P. Prolonged increase of corticosterone secretion by chronic social stress does not necessarily impair immune functions. *Life Sciences*, 1992, 50, 723-731.

Konstantinos, A. P. and Sheridan, J. F. Stress and influenza viral infection: modulation of proinflammatory cytokine responses in the lung. *Respiration Physiology*, 2001, 128, 71-77.

Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., de Ruiter, A. J. H., Meerlo, P. and Sgoifo, A. Social stress in rats and mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 1997, 640, 69-72.

Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Vegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., de Jong, I. C., Ruis, M. A. W. and Blokhuis, H. J. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1999, 23, 925-935.

Kovalovsky, D., Refojo, D., Holsboer, F. and Arzt, E. Molecular mechanisms and Th1/Th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, 109, 23-29.

Koyama, S. and Kamimura, S. Influence of social dominance and female odor on the sperm activity of male mice. *Physiology and Behavior*, 2000, 71, 415-422.

Kusnecov, A. W. and Rabin, B. S. Inescapable footshock exposure differentially alters antigen- and mitogen-stimulated spleen cell proliferation in rats. *Journal of Neuroimmunology*, 1993, 44, 33-42.

//

Lawrence, D. A., Cao, L. and Law. Suppression of host resistance to Listeria monocytogenes by acute cold/restraint stress: lack of direct IL-6 involvement. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 133, 132-143.

Le Moal, M. Approche historique et évolution du concept de stress. Document Power Point. 2003.

Leclerc, C. 1996. Interleukine-10. In *Les Cytokines* (ed. J. M. Cavaillon), pp. 241-251. Masson, Paris.

LeMay, L. G., Vander, A. J. and Kluger, M. J. The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats. *Physiology and Behavior*, 1990, 47, 957-961.

Lenczowski, M. J. P., Bluthé, R.-M., Roth, J., Rees, G. S., Rushforth, D. A., Van Dam, A.-M., Tilders, F. J. H., Dantzer, R., Rothwell, N. J. and Luheshi, G. N. Central

administration of rat IL-6 induces HPA activation and fever but not sickness behavior in rats. *American Journal of Physiology*, 1999, 276, R652-R658.

Lysle, D. T., Cunnick, J. E. and Rabin, B. S. Stressor-induced alteration of lymphocyte proliferation in mice: evidence for enhancement of mitogenic responsiveness. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4, 269-277.

Lyte, M., Nelson, S. G. and Thompson, M. L. Innate and adaptive immune responses in a social conflict paradigm. *Clinical immunology and immunopathology*, 1990, 57, 137-147.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A. R., Cinque, C. and Van Reeth, O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2003, 27, 119-127.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S. and Jestin, A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 1998, 35, 53-72.

Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S. and Smith, R. S. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. *Cytokine*, 1998, 10, 313-318.

Maldonado-Lopez, R. and Moser, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Seminars in Immunology*, 2001, 13, 275-282.

Matthews, S. G. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2002, 13, 373-380.

Matyszak, M. K., Citterio, F., Rescigno, M. and Ricciardi-Castagnoli, P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, 2000, 30, 1233-1242.

Mekaouche, M., Givalois, L., Barbanel, G., Siaud, P., Maurel, D., Malaval, F., Bristow, A. F., Boissin, J., Assenmacher, I. and Ixart, G. Chronic restraint enhances interleukin-1-beta release in the basal state and after an endotoxin challenge, independently of adrenocorticotropin and corticosterone release. *Neuroimmunomodulation*, 1994, 1, 292-299.

Mercado, A. M., Padgett, D. A., Sheridan, J. F. and Marucha, P. T. Altered kinetics of IL-1 alpha, IL-1 beta, and KGF-1 gene expression in early wounds of restrained mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002a, 16, 150-162.

Mercado, A. M., Quan, N., Padgett, D. A., Sheridan, J. F. and Marucha, P. T. Restraint stress alters the expression of interleukin-1 and keratinocyte growth factor at the wound site: an in situ hybridization study. *Journal of Neuroimmunology*, 2002b, 129, 74-83.

Mohamed-Ali, V., Flower, L., Sethi, J., Hotamisligil, G., Gray, R., Humphries, S. E., York, D. A. and Pinkney, J. beta-Adrenergic regulation of IL-6 release from adipose tissue: in vivo and in vitro studies. The *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2001, 86, 5864-5869.

Mohamed, M. A. and Hanson, R. P. Effect of social stress on Newcastle Disease Virus (LaSota) infection. *Avian Diseases*, 1980, 24, 908-915.

Moraska, A., Campisi, J., Nguyen, K. T., Maier, S. F., Watkins, L. R. and Fleshner, M. Elevated IL-1beta contributes to antibody suppression produced by stress. *Journal of Applied Physiology*, 2002, 93, 207-215.

Moraska, A., Deak, T., Spencer, R. L., Roth, D. and Fleshner, M. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2000, 279, R1321-R1329.

Moraska, A. and Fleshner, M. Voluntary physical activity prevents stress-induced behavioral depression and anti-KLH antibody suppression. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2001, 281, R484-R489.

Mormède, P., Courvoisier, H., Ramos, A., Marissal-Arvy, N., Ousova, O., Désautés, C., Duclos, M., Chaouloff, F. and Moisan, M.-P. Molecular genetic approaches to

investigate individual variations in behavioral and neuroendocrine stress responses. *Psychoneuroendocrinology*, 2002, 27, 563-583.

Mormède, P., Dantzer, R., Michaud, B., Kelley, K. W. and Le Moal, M. Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats. *Physiology and Behavior*, 1988, 43, 577-583.

Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A. A., Muraille, E., Van Mechelen, M., Urbain, J. and Leo, O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *European Journal of Immunology*, 1995, 25, 2818-2824.

Moyna, N. M., Acker, G. R., Fulton, J. R., Weber, K., Goss, F. L., Robertson, R. J., Tollerud, D. J. and Rabin, B. S. Lymphocyte function and cytokine production during incremental exercise in active and sedentary males and females. *International Journal of Sports Medicine*, 1996, 17, 585-91.

Moynihan, J. A., Ader, R., Grota, L. J., Schachtman, T. R. and Cohen, N. The effects of stress on the development of immunological memory following low-dose antigen priming in mice. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4, 1-12.

Moynihan, J. A., Karp, J. D., Cohen, N. and Cocke, R. Alterations in interleukin-4 and antibody production following pheromone exposure: role of glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*, 1994, 54, 51-58.

Munck, A., Guyre, P. M. and Holbrook, N. J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 1984, 5, 25-44.

Murray, P. J. and Young, R. A. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infection and Immunity* , 1999, 67, 3087-3095.

Muzio, M. and Mantovani, A. Toll-like receptors. *Microbes and Infection*, 2000, 2, 1-5.

1

Nagano, I., Takao, T., Nanamiya, W., Takemura, T., Nishiyama, M., Asaba, K., Makino, S., De Souza, E. B. and Hashimoto, M. Differential effects of one and repeated endotoxin treatment on pituitary- adrenocortical hormones in the mouse: role of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *Neuroimmunomodulation*, 1999, 6, 284-292.

Netea, M. G., Kullberg, B. J. and Van der Meer, J. W. M. Circulating cytokines as mediators of fever. *Clinical Infectious Diseases*, 2000, 31, S178-S184.

Neveu, P. J. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. *Behavior Genetics*, 1996, 26, 373-377.

Neveu, P. J. Cerebral lateralization and the immune system. *International Review of Neurobiology*, 2003, 52, 303-323.

Nukina, H., Sudo, N., Aiba, Y., Oyama, N., Koga, Y. and Kubo, C. Restraint stress elevates the plasma interleukin-6 levels in germ-free mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2001, 115, 46-52.

Nukina, H., Sudo, N., Komaki, G., Yu, X.-N., Mine, K. and Kubo, C. The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha level. *Neuroimmunomodulation*, 1998, 5, 323-327.

2

O'Connor, K. A., Johnson, J. D., Hammack, S. E., Brooks, L. M., Spencer, R. L., Watkins, L. R. and Maier, S. F. Inescapable shock induces resistance to the effects of dexamethasone. *Psychoneuroendocrinology*, 2003, 28, 481-500.

O'Neill, L. A. J. and Dinarello, C. A. The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunology Today*, 2000, 21, 206-209.

Oakeshott, J. G. Social dominance, aggressiveness and mating success among male house mice (*Mus musculus*). *Oecologia*, 1974, 15, 143-158.

Oishi, K., Nishio, N., Konishi, K., Shimokawa, M., Okuda, T., Kuriyama, T. and Machida, K. Differential effects of physical and psychological stressors on immune functions of rats. *Stress*, 2003, 6, 33-40.

Oka, T., Oka, K. and Hori, T. Mechanisms and mediators of psychological stress-induced rise in core temperature. *Psychosomatic Medicine*, 2001, 63, 476-486.

Orme, I. M., Andersen, P. and Boom, W. H. T cell response to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Infectious Disease*, 1993, 167, 1481-1497.

Otten, W., Puppe, B., Stabenow, B., Kanitz, E., Schön, P. C., Brüssow, K. P. and Nürnberg, G. Agonistic interactions and physiological reactions of top- and bottom-ranking pigs confronted with a familiar and unfamiliar group: preliminary results. *Applied Animal Behaviour Science*, 1997, 55, 79-90.

Owen, N. and Steptoe, A. Natural killer cell and proinflammatory cytokine responses to mental stress: associations with heart rate and heart rate variability. *Biological Psychology*, 2003, 63, 101-115.

3

Pacák, K. and Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews*, 2001, 22, 502-548.

Padgett, D. A., Sheridan, J. F., Dorne, J., Berntson, G. G., Candelora, J. and Glaser, R. Social stress and the reactivation of latent herpes simplex virus type 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 1998, 95, 7231-7235.

Palanza, P. Animal models of anxiety and depression: how are females different? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2001, 25, 219-233.

Palermo-Neto, J., de Oliveira Massoco, C. and Robespierre de Souza, W. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2003, 17, 43-54.

Palucka, K. and Banchereau, J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *Journal of Clinical Immunology*, 1999, 19, 12-25.

Pelletier, M., Forget, A., Bourassa, D., Gros, P. and Skamene, E. Immunopathology of BCG infection in genetically resistant and susceptible mouse strains. *The Journal of Immunology*, 1982, 129, 2179-2185.

Persoons, J. H. A., Berkenbosch, F., Schornagel, K., Thepen, T. and Kraal, G. Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. The *Journal of Allergyand Clinical Immunology*, 1995, 95, 765-770.

Persoons, J. H. A., Moes, N. M., Broug-Holub, E., Schornagel, K., Tilders, F. J. H. and Kraal, G. Acute and long-term effects of stressors on pulmonary immune functions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 1997, 17, 203-208.

Pitman, D. L., Natelson, B. H., Ottenweller, J. E., McCarty, R., Pritzel, T. and tapp, W. N. Effects of exposure to stressors of varying predictability on adrenal function in rats. *Behavioral Neuroscience*, 1995, 109, 767-776.

Puppe, B., Tuchscherer, M. and Tuchscherer, A. The effect of housing conditions and social environment immediately after weaning on the agonistic behaviour, neutrophil/lymphocyte ratio, and plasma glucose level in pigs. *Livestock Production Science*, 1997, 48, 157-164.

4

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J. L., He, L., Lai, W., Dhabhar, F. S. and Sheridan, J. F. Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2003, 137, 51-58.

Quan, N., Avitsur, R., Stark, J. L., He, L., Shah, M., Caligiuri, M., Padgett, D. A., Marucha, P. T. and Sheridan, J. F. Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *Journal of Neuroimmunology*, 2001, 115, 36-45.

5

Raab, A., Dantzer, R., Michaud, B., Mormède, P., Taghzouti, K., Simon, H. and Le Moal, M. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiology and Behavior*, 1986, 36, 223-228.

Ramer-Quinn, D. S., Baker, R. A. and Sanders, V. M. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. *The Journal of Immunology*, 1997, 159, 4857-4867.

Ramer-Quinn, D. S., Swanson, M. A., Lee, W. T. and Sanders, V. M. Cytokine production by naive and primary effector CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2000, 14, 239-255.

Ramírez, F., Fowell, D., Puklavec, M., Simmonds, S. and Mason, D. Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells in vitro. *The Journal of Immunology*, 1996, 156, 2406-2412.

Rinner, I., Schauenstein, K., Mangge, H., Porta, S. and Kvetnansky, R. Opposite effects of mild and severe stress on in vitro activation of rat peripheral blood lymphocytes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1992, 6, 130-140.

Roch, F. and Bach, M.-A. Strain differences in mouse cellular responses to Mycobacterium lepraemurium and BCG subcutaneous infections. II. Production of interleukins 2, 4, and 6 and of interferon-gamma by draining lymph node cells. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1991, 60, 443-454.

Rojas, I.-G., Padgett, D. A., Sheridan, J. F. and Marucha, P. T. Stress-induced susceptibility to bacterial infection during cutaneous wound healing. *Brain, Behavior, and Immunity,* 2002, 16, 74-84.

Romagnani, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Molecular Immunology*, 2001, 38, 881-885.

Rook, G., Baker, R., Walker, B., Honour, J., Jessop, D. S., Hernandez-Pando, R., Arriaga, K., Shaw, R., Zumla, A. and Lightman, S. Local regulation of glucocorticoid activity in sites of inflammation. Insights from the study of tuberculosis. *Annals of the New-York Acadademy of Sciences*, 2000, 917, 913-922.

Ruis, M. A. W., Te Brake, J. H. A., van de Burgwal, J. A., de Jong, I. C., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M. Personalities in female domesticated pigs: behavioural and physiological indications. *Applied Animal Behaviour Science*, 2000, 66, 31-47.

Ruis, M. A. W., de Groot, J., Te Brake, J. H. A., Ekkel, E. D., van de Burgwal, J. A., Erkens, J. H. F., Engel, B., Buist, W. G., Blokhuis, H. J. and Koolhaas, J. M. Behavioral and physiological consequences of acute social defeat in growing gilts: effects of the social environment. *Applied Animal Behaviour Science*, 2001, 70, 201-225.

6

Sachser, N., Dürschlag, M. and Hirzel, D. Social relationships and the management of stress. *Psychoneuroendocrinology*, 1998, 23, 891-904.

Sandi, C., Cambronero, J. C., Borrell, J. and Guaza, C. Effects of HPA hormones on adapted lymphocyte responsiveness to repeated stress. *Brain Research Bulletin*, 1992, 28, 581-585.

Sauer, J., Polack, E., Wikinski, S., Holsboer, F., Stalla, G. K. and Arzt, E. The glucocorticoid sensitivity of lymphocytes changes according to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. *Psychoneuroendocrinology*, 1995, 20, 269-280.

Schmidt, E. D., Binnekade, R., Janszen, A. W. J. W. and Tilders, F. J. H. Short stressor induced long-lasting increases of vasopressin stores in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons in adult rats. *Journal of neuroendocrinology*, 1996, 8, 703-712.

Schmidt, E. D., Janszen, A. W. J. W., Wouterlood, F. G. and Tilders, F. J. H. Interleukin-1-induced long-lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH)--neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Journal of Neuroscience*, 1995, 15, 7417-7426.

Schroeder, K. E., Narkiewicz, K., Kato, M., Pesek, C., Philips, B., Davison, D. and Somers, V. K. Personality type and neural circulatory control. *Hypertension*, 2003, 36, 830-833.

Schuster, J. P. and Schaub, G. A. Experimental Chagas disease: the influence of sex and psychoneuroimmunological factors. *Parasitology Research*, 2001, 87, 994-1000.

Sgoifo, A., Koolhaas, J. M., De Boer, S. F., Musso, E., Stilli, D., Buwalda, B. and Meerlo, P. Social stress, autonomic neural activation, and cardiac activity in rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 1999, 23, 915-923.

Sgoifo, A., Pozzato, C., Costoli, T., Manghi, M., Stilli, D., Ferrari, P. F., Ceresini, G. and Musso, E. Cardiac autonomic responses to intermittent social conflict in rats. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 343-349.

Sgoifo, A., Pozzato, C., Meerlo, P., Costoli, T., Manghi, M., Stilli, D., Olivetti, G. and Musso, E. Intermittent exposure to social defeat and open-field test in rats: acute and long-term effects on ECG, body temperature and physical activity. *Stress*, 2002, 5, 23-35.

Shanks, N. and Kusnecov, A. W. Differential immune reactivity to stress in BALB/cByJ and C57BL/6J mice: in vivo dependence on macrophages. *Physiology and Behavior*, 1998, 65, 95-103.

Sheridan, J. F., Feng, N., Bonneau, R. H., Allen, C., Huneycutt, B. S. and Glaser, R. Restraint stress differentially affects anti-viral cellular and humoral immune responses in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 1991, 31, 245-255.

Sheridan, J. F., Stark, J. L., Avitsur, R. and Padgett, D. A. Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. *Annals of the New-York Academy of Sciences*, 2000, 917, 894-904.

Shurin, M. R., Zhou, D., Kusnecov, A. W., Rassnick, A. and Rabin, B. S. Effect of one or more footshocks on spleen and blood lymphocyte proliferation in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1994, 8, 57-65.

Sonnenfeld, G., Cunnick, J. E., Armfield, A., Wood, P. G. and Rabin, B. S. Stress-induced alterations in interferon production and class II histocompatibility antigen expression. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1992, 6, 170-178.

Stark, J. L., Avitsur, R., Hunzeker, J., Padgett, D. A. and Sheridan, J. F. Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 124, 9-15.

Stark, J. L., Avitsur, R., Padgett, D. A., Campbell, K. A., Beck, F. M. and Sheridan, J. F. Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative Comparative Physiology*, 2001, 280, R1799-R1805.

Steenbergen, H. L., Heinsbroek, R. P. W., Van Haaren, F. and Van de Poll, N. E. Sex-dependent effects of inescapable shock administration on behavior and subsequent escape performance in rats. *Physiology and Behavior*, 1989, 45, 781-787.

Stefanski, V. Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiology and Behavior*, 1998, 63, 605-613.

Stefanski, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology*, 2000, 25, 389-406.

Stefanski, V. Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis. *Physiology and Behavior*, 2001, 73, 385-391.

Stefanski, V. and Engler, H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *Journal of Neuroimmunology*, 1999, 94, 144-152.

Stefanski, V., Peschel, A. and Reber, S. Social stress affects migration of blood T cells into lymphoid organs. *Journal of Neuroimmunology*, 2003, 138, 17-24.

Steptoe, A., willemsen, G., Owen, N., Flower, L. and Mohamed-Ali, V. Acute mental stress elicits delayed increases in circulating inflammatory cytokine levels. *Clinical Scence (London)*, 2001, 101, 185-192.

Stowell, J. R., Kiecolt-Glaser, J. K. and Glaser, R. Perceived stress and cellular immunity: when coping counts. *Journal of Behavioral Medicinz*, 2001, 24, 323-339.

Sugiura, H., Nishida, H. and Mirbod, M. Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiologica Scandinavica*, 2002, 174, 247-256.

Swanson, M. A., Lee, W. T. and Sanders, V. M. IFN-gamma production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. *The Journal of Immunology*, 2001, 166, 232-240.

7

Takaki, A., Huang, Q.-H. and Arimura, **A.** 1996. Is immobilization-induced plasma IL-6 elevation regulated by hepatic innervation? In *Liver Innervation* (ed. Takashi Shimazu), pp. 221-226. John Libbey & Company Ltd,

Takaki, A., Huang, Q.-H., Somogyvari-Vigh, A. and Arimura, A. Immobilization stress may increase plasma interleukin-6 via central and peripheral catecholamines. *Neuroimmunomodulation*, 1994, 1, 335-342.

Tanigawa, K., Craig, R. A., Stoolman, L. M. and Chang, A. E. Effects of tumor necrosis factor-alpha on the in vitro maturation of tumor-reactive effector cells. *Journal of Immunotherapy*, 2000, 23, 528-535.

Theoharides, T. C. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology*, 1998, 139, 403-413.

Tilders, F. J. H. and Schmidt, E. D. Cross-sensitization between immune and non-immune stressors. A role in the etiology of depression? *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1999, 461, 179-197.

Tilg, H., Dinarello, C. A. and Mier, J. W. Il-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology Today*, 1997, 18, 428-432.

Trinchieri, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Current Opinion in Immunology*, 1997, 9, 17-23.

Tuchscherer, M., Puppe, B., Tuchscherer, A. and Kanitz, E. Effect of social status after mixing on immune, metabolic, and endocrine responses in pigs. *Physiology and Behavior*, 1998, 64(3), 353-360.

Van Loo, P. L. P., Mol, J. A., Koolhaas, J. M., Van Zutphen, B. F. M. and Baumans, V. Modulation of aggression in male mice: influence of group size and cage size. *Physiology and Behavior*, 2001, 72, 675-683.

Vekovishcheva, O. Yu., Sukhotina, I. A. and Zvartau, E. E. Co-housing in a stable hierarchical group is not aversive for dominant and subordinate individuals. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2000, 30, 195-200.

Weatherby, K. E., Zwilling, B. S. and Lafuse, W. Resistance of macrophages to Mycobacterium avium is induced by alpha2-adrenergic stimulation. *Infection and Immunity*, 2003, 71, 22-29.

Weidenfeld, J. and Yirmiya, R. Effects of bacterial endotoxin on the glucocorticoid feedback regulation of adrenocortical response to stress. *Neuroimmunomodulation*, 1996, 3, 352-357.

Wilckens, T. and De Rijk, R. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. *Immunology Today*, 1997, 18, 418-424.

Wonnacott, K. M. and Bonneau, R. H. The effects of stress on memory cytotoxic T lymphocyte-mediated protection against herpes simplex virus infection at mucosal sites. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002, 16, 104-117.

Wood, P. G., Karol, M. H., Kusnecov, A. W. and Rabin, B. S. Enhancement of antigen-specific humoral and cell-mediated immunity by electric footshock stress in rats. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1993, 7, 121-134.

Zalcman, S., Minkiewicz-Janda, A., Richter, M. and Anisman, H. Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1988, 2, 254-266.

Zhang, D., Kishihara, K., Wang, B., Mizobe, K., Kubo, C. and Nomoto, K. Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and Th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of Listeria monocytogenes. *Journal of Neuroimmunology*, 1998, 92, 139-151.

Zhou, D., Kusnecov, A. W., Shurin, M. R., DePaoli, M. and Rabin, B. S. Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 1993, 133, 2523-2530.

Zhu, G. F., Chancellor-Freeland, C., Berman, A. S., Kage, R., Leeman, S. E., Beller, D. I. and Black, P. H. Endogenous substance P mediates cold water stress-induced increase in interleukin-6 secretion from peritoneal macrophages. *Journal of Neuroscience*, 1996, 16, 3745-3752.

Zwilling, B. S., Brown, D., Christner, R., Faris, M., Hilburger, M., McPeek, M., Van Epps, C. and Hartlaub, B. A. Differential effect of restraint stress on MHC class II expression by murine peritoneal macrophages. *Brain, Behavior, and Immunity*, 1990, 4, 330-338.

Zwilling, B. S., Brown, D. H. and Pearl, D. Induction of major histocompatibility complex class II glycoproteins by interferon-gamma: attenuation of the effects of restraint stress. *Journal of Neuroimmunology*, 1992, 37, 115-122.

Liste des Abréviations

ACTH	Adénocorticotropine (adenocorticotropin hormone)
BCG	Bacille de Calmette et Guérin. Souche atténuée de *Mycobacterium bovis*.
CBG	Transcortine (Cortico-binding globuline)
CFU	Colony forming unit
CMH I	Complexe majeur d'histocompatibilité de type I
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité de type II
ConA	Concanavaline A, mitogène polyclonal des lymphocytes T
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
CRH	Corticolibérine (cortico-releasing hormone)
CRP	Protéine C-réactive (C-reactive protein)
DC	Cellule dendritique
DEXA	Dexaméthasone (glucocorticoïde de synthèse)
DTH	Réponse d'hypersensibilité retardée (delayed type hypersensitive)
GH	Hormone de croissance (growth hormone)
GnRH	Gonadotropine releasing hormone
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
HHS	Axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien
IgA	Immunoglobuline A, sécrétées au niveau des muqueuses
IgG	Immunoglobulines G, divisées en sous-classes de type 1 (IgG1), 2a (IgG2a)…

IgE	Immunoglobulines E, produites lors des réactions allergiques
IgM	Immunoglobulines M, produites lors d'une réponse primaire
IL-1 (-6 etc)	Interleukine-, interleukine-6, etc
IFN-γ	Interféron-γ
KLH	Keyhole lymphet hemocyanin (protéine antigénique)
LAL	Lignée de souris à latence d'attaque longue
LPS	Lipopolysaccharide
LT-α	Lymphotoxine α
NF-κB	Facteur nucléaire κB (facteur de transcription)
NK	Cellules tueuses naturelles (Natural Killer)
NO	Oxyde nitrique
NR	Porc de style adaptatif non résistant
Nramp 1	Gène de la protéine 1 de résistance naturelle associée aux macrophages
PHA	Phytohémaglutinine A, mitogène polyclonal des lymphocytes T
PPD	Dérivé protéique purifié (Purified Protein derivative) ou tuberculine
PWM	Mitogène pokeweed, mitogène polyclonal des lymphocytes B et T
R	Porc de style adaptatif résistant
SAL	Lignée de souris à latence d'attaque courte
SDR	Social disruption stress
T CD4 ou T4	Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD4 (T auxiliaire)
T CD8 ou T8	Lymphocyte T porteur du marqueur membranaire CD8 (T cytotoxique)

TGF-β Facteur de croissance transformant β (transforming growth factor-β)

Th Lymphocyte T auxiliaires ou T helper

Th1 / Th2 Lymphocyte T auxiliaires de type 1 ou 2, produisant des cytokines de type 1 (IL-2, TNF, IFN-γ) ou de type 2 (IL-4, IL-6, IL-10)

TNF-α Facteur de nécrose tumorale α (tumor necrosis factor α)

TSH Hormone thyréotrope

Formations suivies pendant la thèse

Journées de formation :

Formation INSERM de deux jours « initiation à la prévention des risques professionnels en laboratoire de recherche », 5-6/11/01. ***16 h***

Formation INSERM de deux jours d'initiation à la technique de cytométrie de flux, 18-19/09/01. ***16 h***

Formation ABIES « L'après-thèse ou bien préparer son avenir professionnel », 11-13/03/03. ***18 h***

Formations diplômantes :

Cours d'immunologie générale et d'immunophysiologie des infections, Institut Pasteur, du 02/04/01 au 25/06/01. ***450 h***

Diplôme Universitaire du CESAM (Université Paris VI), modules « Méthodologie » et « Statistiques appliquées à la biologie », année universitaire 2002-03. ***100 h***

Conférences / séminaires :

Séminaire AGRI Bien-être "Cognition animale", 11/12/00. ***5 h***

Séminaire AGRI Bien-être "Sciences humaines et sociales", 05/12/01. ***5 h***

Journées de la Recherche Porcine, 6-7/02/02. ***12 h***

Ecole d'été « Neurobiologie of stress in health and disease », Elbe, Italie, 4-10/05/02. ***50 h***

Conférence internationale « Cytokines and the ageing brain », Arcachon, 2-3/06/02. ***12 h***

Séminaire AGRI Bien-être "Hédonisme et anhédonisme", 25/09/02. ***5 h***

Conférence internationale « Neuroendocrine-Immune Interactions », San Feliu de Guixols, Espagne, 5-10/10/02. ***27 h***

Journées de la Recherche Porcine, 4-6/02/03.	***12 h***
Total :	***728 h***