

CATHERINE-ÈVE MORENCY

**EFFETS DE L'ESTRADIOL ET DE LA  
PROGESTÉRONE SUR LE CONTRÔLE  
RESPIRATOIRE EN SITUATION HYPOXIQUE  
CHEZ LE RATON NOUVEAU-NÉ ET IMPACTS À  
LONG TERME**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en kinésiologie  
pour l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE SOCIALE ET PRÉVENTIVE  
FACULTÉ DE MÉDECINE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

2006

## Résumé

### EFFETS DE L'ESTRADIOL ET DE LA PROGESTÉRONNE SUR LE CONTRÔLE RESPIRATOIRE EN SITUATION HYPOXIQUE CHEZ LE RATON NOUVEAU-NÉ ET IMPACTS À LONG TERME

*Morency CE.*

Département de Pédiatrie, Université Laval, Centre de Recherche (DO-711), Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec (QC), Canada G1L 3L5

Notre hypothèse est que l'estradiol ( $E_2$ ) et la progestérone (PR) participent au développement des chémorécepteurs périphériques et affectent les réponses métaboliques et ventilatoires à l'hypoxie des rats. Des rates lactantes sont traitées durant 14 jours avec une solution véhicule ou de l'estradiol ( $7.14\mu\text{g}/\text{jour}$ ) ou de la progestérone ( $1\text{mg}/\text{jour}$ ) ou de la combinaison  $E_2$ +PR à l'aide de micropompes osmotiques. Des mesures de ventilation et de métabolisme par pléthysmographie barosensible sont effectuées sur les ratons âgés de 10 jours (P10) ou de 60 jours (P60) en normoxie et en réponse à une hypoxie aiguë. En normoxie à P10,  $E_2$  réduit le métabolisme, la fréquence respiratoire et la température rectale. En hypoxie à P10,  $E_2$  abolie la réponse thermique et PR stimule la réponse ventilatoire. À P60, toutes situations confondues, PR augmente le métabolisme et  $E_2$  diminue la fréquence respiratoire et augmente le volume courant .

## Summary

### ESTRADIOL AND PROGESTERONE EFFECTS ON RESPIRATORY AND METABOLIC CONTROL OF NEWBORN RATS IN HYPOXIA AND LONG TERM IMPACTS

*Morency CE.*

Département de Pédiatrie, Université Laval, Centre de Recherche (DO-711), Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Québec (QC), Canada G1L 3L5

This study describes the effects of estradiol (E<sub>2</sub>) and progesterone (PR) in the development of the metabolic and respiratory responses in hypoxia of adult and newborn male rats. Methods: lactating mothers were implanted with a subcutaneous osmotic micropompe which deliver E<sub>2</sub> (7.14µg/day) or PR (1mg/day) or both or control solution. By plethysmography technic, we analysed ventilation and metabolism under normoxic and hypoxic condition at day 10<sup>th</sup> (P10) and at day 60<sup>th</sup> (P60). In P10 rat, our results show that E<sub>2</sub> reduces metabolism, respiratory frequency and basal thermoregulation in normoxia. When exposed to hypoxia, estradiol maintains the body temperature whereas PR and control's temperature decrease. Moreover, PR induces an increase of ventilatory response. Regarding to long term effects of neonatal steroids in normoxia and hypoxia, PR increases metabolism and E<sub>2</sub> decreases the respiratory frequency and increases the tidal volume.

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord transmettre mes plus sincères remerciements à mon directeur de recherche, le Dr Vincent Joseph, qui a su m'épauler tout au long de cette maîtrise. Son dévouement et sa disponibilité exceptionnelle ont grandement contribué à développer mon esprit et mes connaissances scientifiques.

Un merci tout spécial à Van Diep Doan pour son implication constante dans l'élaboration de mon projet de recherche et sa grande patience. Merci à Dr Aida Bairam, Dr Richard Kinkead, Dr Roumiana Gulemetova et Yves Lajeunesse qui m'ont donné la chance d'évoluer dans un environnement dynamique, enrichissant et très formateur. Merci à mes collègues étudiants, en particulier Raluca, Mirza, Gaspard et Sophie-Emmanuelle, qui ont souvent répondu à mes questions et n'ont jamais hésité à me venir en aide. Merci à Évelyne Vachon et Sylvie Vigner, les techniciennes animalières, pour leurs précieux conseils lors des chirurgies.

Je tiens à remercier tous les membres multiculturels de mon équipe de recherche avec qui j'ai partagé de très bons moments et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir lors d'activités sociales et sportives. Finalement, ce processus m'a été grandement facilité par l'appui, l'aide et le support de différentes personnes et organismes, me touchant de près ou de loin.

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	i
<b>Summary</b> .....	ii
<b>Remerciements</b> .....	iii
<b>Table des matières</b> .....	iv
<b>Liste des tableaux</b> .....	vii
<b>Liste des figures</b> .....	viii
<b>Liste des abréviations</b> .....	ix
<b>Chapitre I : Introduction</b> .....	1
▪ 1.1 Problématique.....	2
▪ 1.2 Définition CB.....	3
○ 1.2.1 CB et chémorécepteurs périphériques : rôles physiologiques.....	4
○ 1.2.2 CB : développement et contrôle respiratoire.....	4
○ 1.2.3 Rôles des chémorécepteurs périphériques dans la mise en place des réponses ventilatoires.....	5
○ 1.2.4 Répercussions chez les enfants prématurés : pathologies associées.....	6
▪ 1.3 Nouveaux-nés prématurés et hormones stéroïdiennes.....	8
○ 1.3.1 Différences: bébé né à terme vs prématuré.....	8
○ 1.3.2 Mécanismes d'action possibles des stéroïdes placentaires sur la respiration.....	8
○ 1.3.3 Ce que l'on sait du rôle de l'E <sub>2</sub> et de la PR sur le contrôle de la respiration.....	9
○ 1.3.4 Remplacement de l'E <sub>2</sub> et de la PR déficitaires chez les prématurés ?.....	10
▪ 1.4 Plasticité respiratoire et modulation.....	10
○ 1.4.1 Définition de la plasticité.....	11
○ 1.4.2 Définition de la modulation.....	11
○ 1.4.3 Différences entre modulation et plasticité.....	11
○ 1.4.4 Réponse ventilatoire à l'hypoxie et plasticité respiratoire.....	12
▪ 1.5 Objectifs de la recherche.....	12

○ 1.5.1 Objectif général.....	13
○ 1.5.2 Objectifs spécifiques.....	13
▪ 1.6 Hypothèses de recherche.....	14
<b>Chapitre II : Matériels &amp; Méthodes.....</b>	<b>15</b>
▪ 2.1 Animaux utilisés.....	16
▪ 2.2 Plan expérimental.....	17
▪ 2.3 Choix du modèle expérimental.....	18
▪ 2.4 Traitement des femelles lactantes aux hormones stéroïdiennes.....	18
▪ 2.5 Avantages de l'utilisation des micropompes osmotiques.....	19
▪ 2.6 Mode de fonctionnement des micropompes osmotiques.....	20
▪ 2.7 Méthode d'analyse du niveau hormonal sanguin.....	20
▪ 2.8 Méthode de la pléthysmographie.....	21
▪ 2.9 Unités des paramètres mesurés au pléthysmographe.....	24
▪ 2.10 Méthode d'analyse statistique.....	24
<b>Chapitre III : Résultats.....</b>	<b>25</b>
▪ 3.1 Première partie des résultats: Dosage du sérum sanguin.....	26
▪ 3.2 Deuxième partie des résultats : Effets à court terme des suppléments d'estradiol et de progestérone : analyse du raton de 10 jours.....	27
○ 3.2.1 Poids des animaux de 10 jours.....	27
○ 3.2.2 Enregistrements en normoxie des rats de 10 jours.....	28
○ 3.2.3 Enregistrements en hypoxie des rats de 10 jours.....	32
▪ 3.3 Troisième partie des résultats : Effets à long terme des suppléments d'estradiol et de progestérone : analyse du rat à 2 mois.....	36
○ 3.3.1 Poids des animaux de 2 mois.....	36
○ 3.3.2 Enregistrements en normoxie des rats de 2 mois.....	38
○ 3.3.3 Enregistrements en hypoxie des rats de 2 mois.....	40
<b>Chapitre IV : Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rat.....</b>	<b>44</b>
▪ Résumé de l'article.....	45
▪ Avant-propos.....	46
▪ Abstract.....	47

▪ Article.....	48
<b>Chapitre V : Discussion &amp; Conclusion.....</b>	<b>71</b>
▪ 5.1 Rappel.....	72
▪ 5.2 Ce que démontrent les résultats.....	72
○ 5.2.1 Le corps carotidien démontre une expression des récepteurs à l'estradiol et à la progestérone.....	72
○ 5.2.2 Le traitement d'estradiol combiné à la progestérone influence fortement le poids des ratons à l'âge de 10 jours et celui des rats de 2 mois.....	73
○ 5.2.3 L'estradiol est un facteur de réduction du métabolisme, de la FR et de la thermorégulation de base chez les ratons de 10 jours.....	73
○ 5.2.4 Chez les ratons en situation hypoxique, la progestérone influence la ventilation et l'estradiol abolie la réponse thermal.....	74
○ 5.2.5 Effets des hormones stéroïdiennes sur les paramètres ventilatoires en situation normale et en situation hypoxique des animaux de 2 mois.....	74
○ 5.2.6 Effets des hormones stéroïdiennes sur le métabolisme des animaux âgés de 2 mois en situation normale et en situation hypoxique.....	74
▪ 5.3 Considérations méthodologiques.....	75
○ 5.3.1 Technique de l'implantation des micropompes osmotiques.....	75
○ 5.3.2 Importance de la plasticité respiratoire dans l'élaboration du protocole.....	76
○ 5.3.3 Risques des thérapies utilisant des hormones sexuelles stéroïdiennes.....	77
▪ 5.4 Perspectives.....	77
▪ 5.5 Conclusion.....	79
<b>Références.....</b>	<b>80</b>

## Liste des tableaux

- **Tableau 1** : Valeurs obtenues pour le dosage du sérum sanguin.....26
- **Tableau 2** : Résultats avec correction pour les facteurs allométriques des ratons nouveaux-nés en situation normoxique.....32
- **Tableau 3** : Données brutes des résultats des ratons nouveaux-nés en hypoxie et résultats avec la correction pour les facteurs allométriques.....35
- **Tableau 4** : Résultats avec la correction pour les facteurs allométriques des adultes en situation normoxique.....40
- **Tableau 5** : Données brutes des résultats des adultes en hypoxie et résultats avec la correction pour les facteurs allométriques.....43

## Liste des figures

▪ <b>Figure 1A</b> : Corps carotidien.....	3
▪ <b>Figure 1B</b> : Vascularisation du corps carotidien.....	3
▪ <b>Figure 2</b> : Résumé des facteurs pouvant modifier la chémosensitivité.....	7
▪ <b>Figure 3</b> : Modulation & plasticité.....	12
▪ <b>Figure 4</b> : Mère et ses ratons.....	16
▪ <b>Figure 5</b> : Pompe osmotique.....	20
▪ <b>Figure 6</b> : Raton de 10 jours dans un pléthysmographe.....	21
▪ <b>Figure 7</b> : Variation de la concentration d'oxygène en fonction du temps.....	23
▪ <b>Figure 8</b> : Poids des ratons de 10 jours.....	28
▪ <b>Figure 9</b> : Ratons de 10 jours en situation normoxique.....	30
▪ <b>Figure 10</b> : Ratons de 10 jours en situation hypoxique.....	33
▪ <b>Figure 11</b> : Poids des animaux de 2 mois.....	36
▪ <b>Figure 12</b> : Résultats des rats âgés de 2 mois et ayant été traités durant 2 semaines postnatales aux hormones stéroïdiennes en situation normale.....	37
▪ <b>Figure 13</b> : Résultats des rats âgés de 2 mois et ayant été traité durant 2 semaines postnatales aux hormones stéroïdiennes en situation hypoxique.....	41

## Liste des abréviations

**ATPS** : indique que la mesure a été effectuée a température ambiante et à un niveau d'humidité saturé.

**BPD** : dysplasie broncho-pulmonaire

**BTPS** : indique que les volumes pulmonaires ont été normalisés à la température corporelle et à un niveau d'humidité saturé.

**BW** : poids du corps

**C** : cycle

**°C** : degrés Celcius

**CB** : corps carotidien

**CO<sub>2</sub>** : dioxyde de carbone

**E<sub>2</sub>** : estradiol / C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>

**FR** : fréquence respiratoire

**g** : gramme

**h** : heure

**Hb** : hémoglobine

**j** : jour

**kg** : kilogramme

**LSD** : test statistique de la plus petite différence significative

**mg** : miligramme

**ml** : millilitre

**mn** : minute

**n** : nombre

**N / Nor** : normoxie

**O<sub>2</sub>** : oxygène

**p** : probabilité obtenue

**PaO<sub>2</sub>** : pression partielle d'oxygène artérielle

**PLSD** : test du LSD utilisé à posteriori

**Pr** : probabilité utilisée pour déterminer les tests statistiques significatifs

**PR** : progestérone / C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>

**P10** : raton âgé de 10 jours

**P11** : ratons âgés de 11 jours

**P60** : rat âgé de 60 jours

**S.E.M.** : erreur standard moyenne

**SIDS** : syndrome de mort subite des nourrissons

**Temp./T°** : température

**VCO<sub>2</sub>** : volume de dioxyde de carbone

**Ve** : ventilation

**Vt** : volume courant

**µg** : microgramme

**µl** : microlitre

**µm** : micromètre

**Δ** : différence

**%** : pourcentage

# **CHAPITRE I :**

# **INTRODUCTION**

## 1.1 Problématique

L'apnée et l'immaturation du système de contrôle respiratoire constituent un problème important chez les nouveaux-nés prématurés [1]. De ce fait, 25% des bébés qui pèsent moins de 2500g et 80% des bébés de moins de 1000g ont des épisodes d'apnée en période néonatale [2]. De plus, des épisodes significatifs peuvent perdurer lorsque l'enfant approche de la décharge hospitalière [3]. Chez les nouveaux-nés présentant des instabilités respiratoires, l'hypoxie entraîne une déficience énergétique qui engendre une large étendue de réponses métaboliques afin de préserver l'homéostasie. Concrètement, cela peut avoir des répercussions sur le dysfonctionnement de plusieurs organes de l'organisme, augmenter le risque de maladies cardiovasculaires et établir les mécanismes qui sont à la base du développement du syndrome métabolique survenant à l'âge adulte. Le syndrome métabolique faisant référence à la situation clinique regroupant l'obésité centrale, le diabète de type II et l'hypertension [4].

### **Connaît-on la cause de l'instabilité respiratoire?**

L'instabilité du contrôle respiratoire des enfants prématurés, laquelle est caractérisée par des respirations périodiques et/ou des apnées, pourrait résulter de la suractivité des chémorécepteurs périphériques et de leurs réponses aux fluctuations rapides dans la PaO<sub>2</sub> (pression partielle artérielle d'oxygène) [5]. Cette instabilité respiratoire peut prédisposer ces bébés à de futurs épisodes d'apnée [6], venant ainsi confirmer le rôle attribué aux chémorécepteurs périphériques dans l'initiation des apnées chez les modèles animaux expérimentaux [7] [8].

### **Comment prévenir ou traiter l'instabilité respiratoire?**

Un des traitements possibles serait de combler le déficit chronique de stéroïdes placentaires survenant chez le nouveau-né prématuré. L'estradiol et la progestérone, lesquels sont notamment connus comme stimulants respiratoires chez l'adulte, pourraient être utilisés. Jusqu'à maintenant les études effectuées sur les animaux semblent suggérer que ces hormones offriraient un potentiel thérapeutique pour contrer les problèmes respiratoires associés à la prématurité. Il convient de poursuivre les études afin de savoir avec certitude

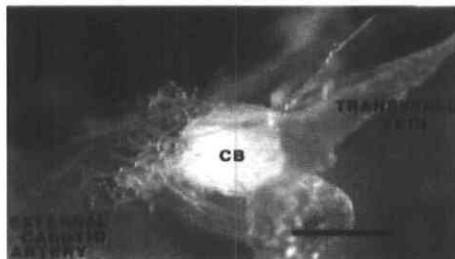
si l'estradiol et la progestérone seul ou en combinaison confère des bénéfices thérapeutiques significatifs pour le prématuré [9].

Dans les sections suivantes de cette introduction, il sera question des rôles physiologiques associés aux chémorécepteurs périphériques, de leurs impacts sur le contrôle respiratoire à travers la maturation du système, du rôle des stéroïdes ovariens sur le chémoréflexe respiratoire et des répercussions chez les enfants prématurés.

## 1.2 Définition du corps carotidien

Le corps carotidien (CB) est un organe situé à la bifurcation des artères carotides communes interne et externe (fig.1A). Il est sensible à l'oxygène et au CO<sub>2</sub> sanguin et il est remarquablement vascularisé (fig.1B). En tenant compte du poids de cet organe, sa

**Figure 1A : CB**



**Figure 1B : vascularisation**



### Légende :

**Figure 1A\*:** Photographie en lumière visible du corps carotidien d'un chat.

Le corps carotidien (CB) est un organe hautement vascularisé.

Barre de calibration, 450 µm.

**Figure 1B\*:** Vascularisation du corps carotidien.

Lorsqu'examiné par SEM (scanning electron micrograph), la plupart du glomus carotidien est composé d'un réseau tortueux de capillaires et superficiellement d'anastomoses artério-veineuses (le plus petit diamètre est approximativement de 25µm). A\*, anastomosis. Barre de calibration, 250µm.

*\*Figures de Ennis, R.G. O'Regan and J. Bannigan publiées par James F.X. Jones 2004.*

vascularisation est environ 20 fois supérieure à celle du cerveau. Il est innervé par des fibres motrices provenant du système nerveux sympathique via le ganglion cervical supérieur et aussi de fibres sensibles provenant du système nerveux parasympathique via le nerf glosso-pharyngien (nerf crânien no.IX) [10]. Les terminaisons synaptiques de fibres sensibles projettent dans le tronc cérébral, plus précisément dans le NTS (nucleus tractus solitarius) [11]. Les afférences du corps carotidien au NTS génèrent des réponses réflexes cardiovasculaires importantes qui se développent en période postnatale [12].

### **1.2.1 Corps carotidien et chémorécepteurs périphériques : rôles physiologiques**

Les chémorécepteurs périphériques artériels sont situés à l'intérieur du corps carotidien lequel est positionné entre la carotide interne et externe. Le corps carotidien contient un riche réseau de vaisseaux vasculaires, de fibres nerveuses du nerf du sinus carotidien (une branche du neuvième nerf crânien), de fibres nerveuses parasympathique et sympathique, de cellules gliales de type II et de cellules spécialisées de type I. Les cellules de type I se dépolarisent en réponse à des stimuli naturels tel que l'hypoxie, l'hypercapnie, l'acidité, la température et sont d'importants promoteurs de l'éveil en réponse à ces stimuli chez des sujets endormis. Leur principale fonction est leur capacité à ressentir les changements de la tension en oxygène artériel rapidement et de modifier la ventilation de façon appropriée pour maintenir l'homéostasie. Les cellules du glomus carotidien sont à l'origine de ce que l'on appelle le chémoréflexe périphérique [13] [14].

Comment le développement affecte-t-il la réponse des chémorécepteurs périphériques? Des expositions environnementales pré- et postnatale à l'hypoxie, à l'hypercapnie ou à certaines drogues telle que la nicotine, altèrent ou modifient de façon persistante la réponse des chémorécepteurs périphériques et augmentent ainsi les risques de désordres respiratoires du nouveau-né.

### **1.2.2 Corps carotidien : développement et contrôle respiratoire**

Le développement du système de contrôle respiratoire commence tôt durant la gestation et n'atteint sa maturité qu'après des semaines ou des mois suivant la naissance. Jusqu'à

récemment, la maturation du système de contrôle respiratoire était pensée comme étant quelque chose d'inchangeable, un programme génétique relativement prédéterminé. Mais de plus en plus des évidences démontrent que le développement du système de contrôle respiratoire consiste en des interactions complexes et dynamiques influencées par une multitude de facteurs pouvant modifier les réponses futures. En effet, les mammifères démontrent une plasticité lors du développement du contrôle respiratoire. Des altérations permanentes du système de contrôle respiratoire peuvent être produites par l'environnement au cours d'une période critique du développement [15].

En période postnatale, des changements significatifs du système de contrôle respiratoire surviennent et ce, tant chez les animaux que chez l'homme. Chez les animaux, des études ont démontré que la réponse ventilatoire à l'hypercapnie du rat nouveau-né augmente durant les deux semaines suivant la naissance [16]. Chez l'homme, des changements significatifs des réponses ventilatoires en situation hypoxique aiguë surviennent au cours de la période postnatale. Par exemple en situation hypoxique à 16 % d'oxygène, la réponse ventilatoire augmente graduellement au cours des deux premières semaines de vie du nouveau-né [17]. De plus, les nouveaux-nés démontrant des instabilités respiratoires, lesquelles sont caractérisées par des respirations périodiques et/ou des apnées, ont une réponse ventilatoire réduite à l'hypercapnie en période postnatale [18].

### **1.2.3 Rôle des chémorécepteurs périphériques dans la mise en place des réponses ventilatoires**

Chez les mammifères, les principaux senseurs périphériques du niveau d'oxygène artériel sont les corps carotidiens, lesquels procurent la commande principale qui soutient la réponse ventilatoire à l'hypoxie [19]. Suite à la naissance, les corps carotidiens démontrent initialement une faible sensibilité à l'hypoxie qui devient de plus en plus forte au cours des premiers jours et premières semaines de vie [20]. Chez le fœtus, ils sont actifs dès la 28<sup>ième</sup> semaine de gestation [21] et leur activité semble plus forte chez les bébés que chez les adultes, indiquant qu'ils contribuent plus à la respiration au cours de cette période [5]. Cependant, les chémorécepteurs périphériques ne contribuent pas beaucoup à la respiration

fœtale durant la gestation [22]. À la naissance, de manière transitoire, l'activité des chémorécepteurs augmente due à l'activation sympathique et à la désaturation de l'hémoglobine [22, 23]. Les nouveaux-nés prématurés présentant des apnées persistantes démontrent une forte activité des chémorécepteurs périphériques caractérisée par une augmentation initiale de la ventilation et une diminution de la dépression de la ventilation lors de l'hypoxie [6]. Des études effectuées sur des chèvres et des chats suggèrent que la réduction de la  $\text{PaO}_2$  stimule fortement les corps carotidiens, induisant donc une augmentation rapide de la ventilation [24].

L'activité des chémorécepteurs périphériques n'est pas nécessaire à la mise en place du rythme respiratoire à la naissance [25]. Cependant, de nombreuses études proposent que les chémorécepteurs périphériques artériels contribuent à stabiliser la ventilation au cours de la période critique du développement au début de la vie postnatale et participent à l'établissement de la rythmogénèse qui est maintenue tout au long de la vie [26] [27]. Un développement déficitaire des chémorécepteurs périphériques chez les mammifères a pour conséquence une importante dysfonction de la respiration et, en particulier, lors du sommeil [28]. Des études chez les porcelets ont même démontré que, contrairement aux adultes, la dénervation du nerf sinus carotidien du nouveau-né provoque des anomalies du contrôle respiratoire et des taux élevés de mortalité, suggérant l'existence d'une période vulnérable lors de la maturation postnatale des mammifères [29].

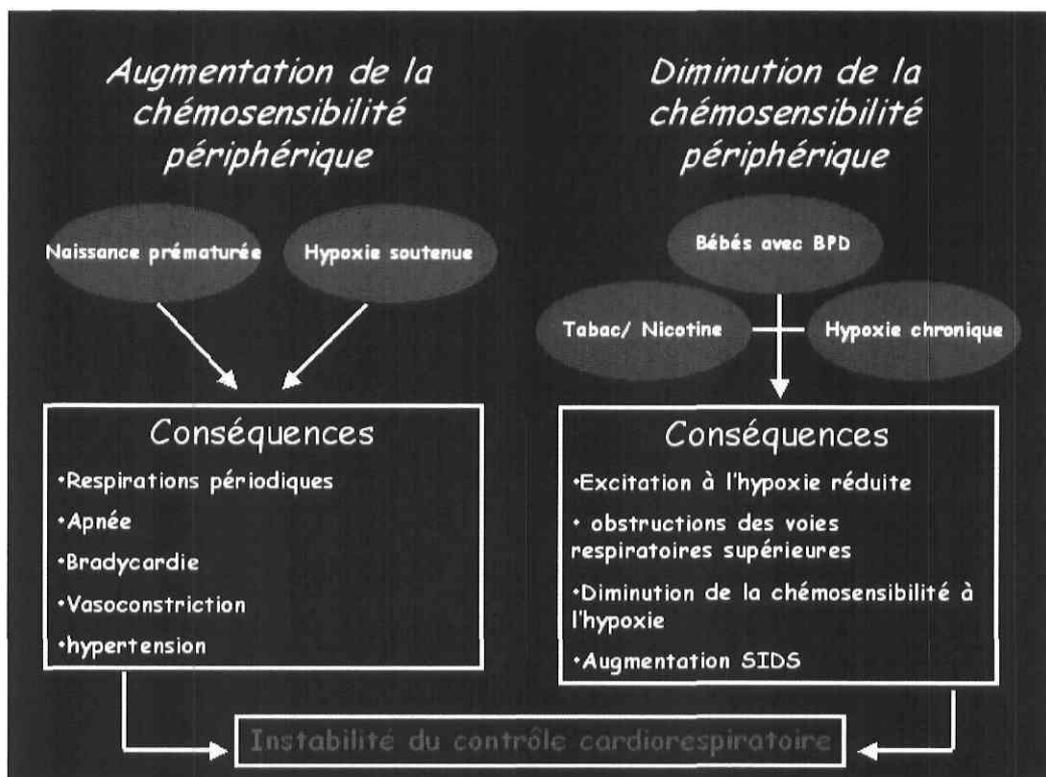
#### **1.2.4 Répercussions chez les enfants prématurés : pathologies associées**

Des avancées en soins périnataux et néonataux ont permis aux enfants prématurés de survivent à des naissances survenant peu après la moitié de la gestation, soit 24-25 semaines [30] [31]. Chez ces prématurés, des respirations périodiques et des apnées sont couramment observées et ces patrons respiratoires ressemblent à ceux observés chez le fœtus. Ces patrons sont inversement reliés à l'âge gestationnel ; les plus jeunes enfants présentent des épisodes d'apnées plus fréquents et durant leur croissance la fréquence des épisodes d'apnée diminue [32-34]. Chez les enfants prématurés, une augmentation de la fonction des chémorécepteurs périphériques peut entraîner des apnées, des bradycardies ou

des désaturations Hb. De plus, la maturation postnatale de la réponse des chémorécepteurs périphériques peut être altérée par des variations du niveau d'oxygène durant le début de la vie postnatale. Il est possible que l'apnée du prématuré soit associée à long terme à une augmentation de la morbidité [35]. En effet, la bradycardie et la désaturation de l'hémoglobine associée aux apnées pourraient augmenter le risque de morbidité gastro-intestinale et neurologique [35]. Cependant, il ne faut pas oublier que les changements induits par l'hypoxie sur les chémorécepteurs périphériques peuvent varier en fonction de l'espèce, la durée de l'exposition à l'hypoxie, et le nombre d'expositions hypoxiques [5, 21, 36].

La figure suivante résume le développement normal et anormal des chémorécepteurs périphériques et leurs rôles possibles dans l'apnée du prématuré au cours de la période néonatale [37].

**Figure 2 : Résumé des facteurs pouvant modifier la chémosensitivité**



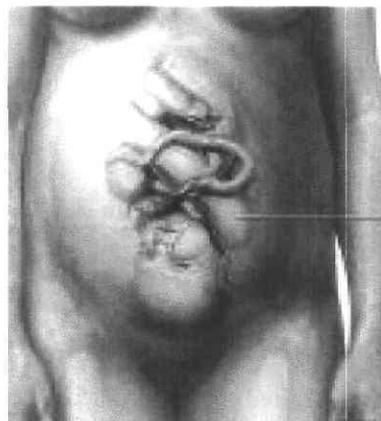
**Figure 2 modifiée de Gauda EB, 2003** : résumé des conditions cliniques et expositions qui surviennent chez le nouveau-né et qui sont associées à une augmentation ou une diminution de la chémosensibilité des

récepteurs périphériques, lesquels peuvent résulter en des conséquences physiologiques conduisant à une instabilité du contrôle cardiorespiratoire et plaçant l'enfant à un risque accru de désordres respiratoires. BPD, bronchopulmonary dysplasia; SIDS, sudden infant death syndrome. [37]

### 1.3 Nouveaux-nés prématurés et hormones stéroïdiennes

#### 1.3.1 Différences : bébé né à terme vs prématuré

Il existe plusieurs différences environnementales auxquelles est confronté le bébé prématuré par rapport à celui à terme. Il a été démontré que la femme enceinte sécrète 100 fois plus d'estrogène que la femme qui ne l'est pas [38] et que la concentration plasmatique fœtale de progestérone (PR) est élevée [39]. C'est par l'intermédiaire du placenta que le fœtus est exposé à des concentrations élevées de progestérone et



d'estradiol ( $E_2$ ) au cours de la gestation [40]. L'estradiol fait partie du groupe d'hormones sexuelles stéroïdiennes appelé estrogène. Après le premier trimestre de gestation, le placenta est la principale source de sécrétion de progestérone et d'estradiol [41]. Aussi, ces taux reviennent à la normale dans les 24 heures suivant l'accouchement. Les bébés prématurés sont privés de la circulation normale de stéroïdes fournis par le placenta et souffrent de cette privation. Ce déficit chronique d'estradiol et de progestérone pourrait être en partie lié à l'apparition des problèmes respiratoires [42].

#### 1.3.2 Mécanismes d'action possibles des stéroïdes placentaires sur la respiration

Les hormones sexuelles stéroïdiennes tels que l'estrogène, la progestérone et la testostérone jouent un rôle important dans une large variété de processus physiologiques. En particulier, l'estrogène et la progestérone ont un effet sur le contrôle de la respiration. Il y a plusieurs façons par lesquelles ces hormones pourraient influencer le contrôle neural de la respiration :

- 1) un effet direct sur les motoneurones et leurs réseaux de noyaux moteurs respiratoires
- 2) un effet sur les neurones prémoteurs du tronc cérébral
- 3) un effet sur les neurones générateurs du rythme respiratoire situés au niveau du tronc cérébral
- 4) un effet sur les systèmes neuromodulateurs qui influencent les neurones prémoteurs et moteurs
- 5) un effet sur les chémorécepteurs périphériques et centraux

Nous retiendrons particulièrement ce dernier aspect, qui est un élément clé dans le cadre de cette étude.

### **1.3.3 Ce que l'on sait du rôle de l'estradiol (E<sub>2</sub>) et de la progestérone (PR) sur le contrôle de la respiration**

Chez le mammifère adulte, les hormones stéroïdiennes sont connues en tant que stimulants respiratoires agissant à la fois sur le système nerveux central et périphérique en augmentant la respiration de base et la réponse à l'hypoxie. Il a déjà été démontré que l'estradiol seule n'augmente pas la réponse ventilatoire à l'hypoxie, mais la combinaison d'estradiol et de progestérone permet d'augmenter l'impact de la progestérone seule sur le contrôle ventilatoire [43]. Le rôle et l'influence des hormones stéroïdiennes ont été bien étudié chez le mammifère adulte, mais malgré l'influence des hormones tout au long de la vie, leurs effets sur le contrôle respiratoire en période postnatale ne sont pas encore bien connus. Néanmoins, il semble que l'exposition aux stéroïdes périnataux pourraient influencer les composantes périphériques et centrales du système de contrôle respiratoire et engendrer une plasticité au cours du développement. Effectivement, de récentes expériences auxquelles j'ai participé au sein de notre laboratoire ont démontré que les récepteurs à l'estradiol et à la progestérone étaient exprimés dans le corps carotidien des rats mâles nouveaux-nés, supportant ainsi l'hypothèse de l'effet direct de ces hormones stéroïdiennes sur la fonction et le développement du corps carotidien au cours de la période néonatale [1]. De plus, un lien a été établi entre le niveau maternel d'estradiol à la fin de la gestation et le phénotype

respiratoire du rat nouveau-né, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le développement du contrôle respiratoire [44].

### **1.3.4 Remplacement de l'E<sub>2</sub> et de la PR déficitaires chez les prématurés?**

En se basant sur des observations chez les humains et/ou sur des données d'expériences sur des animaux, plusieurs rôles ont été avancés quant aux bénéfices des hormones stéroïdiennes sur le développement des nouveaux-nés. Ces bénéfices comprennent la réduction des maladies pulmonaires chroniques [45, 46], l'amélioration de la densité osseuse [47] et l'amélioration du développement neurologique [48]. Toutefois, ces études ne supportent pas encore la mise en place d'un traitement routinier de remplacement de l'estradiol et de la progestérone, seul ou en combinaison chez les enfants prématurés. Par contre, une autre étude suggère qu'il n'existe pas d'effets négatifs à court terme lors du maintien de la concentration d'estrogène et de progestérone à des niveaux similaires à ceux *in utero* [49]. Une meilleure compréhension des effets des stéroïdes placentaires chez le fœtus pourrait conduire à des interventions thérapeutiques plus spécifiques lors d'anomalies du contrôle respiratoire. De plus amples études sont requises afin de déterminer si l'administration d'estrogène et de progestérone seul ou en combinaison, à différentes doses, confère des bénéfices cliniques significatifs ou engendre des risques pour la santé de l'enfant prématuré [9].

Autant les effets d'une privation d'hormones placentaires sur le développement des organes des nouveaux-nés prématurés, que les effets induits par un remplacement de ces hormones restent encore mal connus. Parce que les bénéfices d'un remplacement à court terme pourraient engendrer des effets indésirables à long terme, il est important d'aborder la notion de plasticité et de modulation respiratoire.

## **1.4 Plasticité respiratoire et modulation**

La plasticité est une propriété fondamentale du système nerveux. Traditionnellement, il était pensé que le système nerveux de contrôle respiratoire était fixe et immuable. Cependant, depuis plusieurs années, des évidences s'accumulent démontrant que le système

de contrôle respiratoire possède une impressionnante plasticité tout comme les autres régions du système nerveux [15]. Par exemple, l'étude de Genest et al. (2004) a démontré qu'un stress en période néonatale, une séparation maternelle, affectait le développement du système de contrôle respiratoire en augmentant de 25% la réponse ventilatoire à l'hypoxie des rats adultes [50].

#### **1.4.1 Définition de la plasticité**

La plasticité est un changement persistant du système de contrôle neural (morphologique et/ou fonctionnel) basé sur des expériences passées. Ces expériences incluent l'activité neuronale, l'hypoxie, les blessures, les maladies, les interventions pharmacologiques ou un conditionnement et peuvent survenir durant le développement ou chez l'adulte [15].

Un exemple de plasticité dans le contrôle respiratoire est la facilitation à long terme du nerf phrénique suivant l'hypoxie intermittente. Cette facilitation est caractérisée par une augmentation du signal respiratoire moteur au delà de la présence du stimulus [51].

#### **1.4.2 Définition de la modulation**

La modulation est une altération neurochimique qui peut ajuster ou même transformer le fonctionnement du réseau neural. La modulation est typiquement de courte durée comparativement à la plasticité et n'est pas présente lorsque le neuromodulateur n'y est pas.

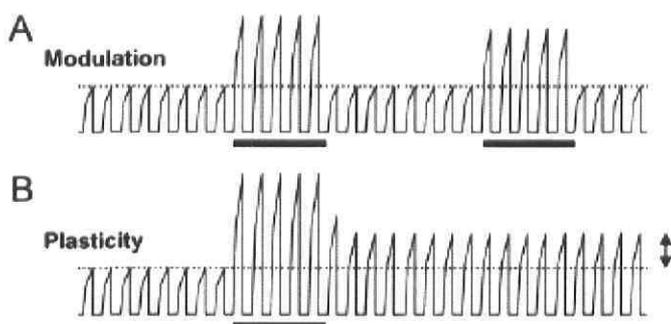
#### **1.4.3 Différences entre modulation et plasticité**

Il est important de différencier la modulation et la plasticité, car elles ont beaucoup de points en commun et aussi de nombreuses différences. En effet, la modulation joue un rôle dans l'initiation et/ou la maintenance de la plasticité.

La modulation et la plasticité pour le contrôle moteur respiratoire sont représentées à la figure 3 [15]. Les tracés représentent l'intégration d'une activité respiratoire hypothétique avant, pendant et après des perturbations physiologiques ou expérimentales représentées

par les traits noir horizontaux. **A** : la modulation facilitatrice est illustrée comme une augmentation de l'activité respiratoire motrice lorsque le neuromodulateur est actif (trait noir). Lors que le neuromodulateur est retiré, l'activité respiratoire revient rapidement au niveau normal. **B** : la plasticité est une augmentation persistante de l'activité motrice respiratoire qui se poursuit même après le stimulus initial (trait noir). La plasticité est donc un changement dans le comportement futur du système basé sur l'expérience.

**Figure 3 : Modulation & plasticité**



#### 1.4.4 Réponse ventilatoire à l'hypoxie et plasticité respiratoire

La réponse ventilatoire à l'hypoxie est caractérisée par une composante excitatrice (les récepteurs périphériques des corps carotidiens) et en une composante inhibitrice (la dépression du système nerveux central). Une seule exposition à l'hypoxie peut modifier les réponses subséquentes à ce même stimulus, c'est-à-dire induire une plasticité. [52, 53]. La réponse à l'hypoxie possède la capacité de se modifier et de s'adapter selon les expériences passées (plasticité neurale). Il donc est important de réaliser que lorsque la maladie survient, les réponses de la plasticité neurale peuvent devenir mal adaptées et augmenter la vulnérabilité de l'individu [36, 54].

### 1.5 Objectifs de la recherche

Nous avons récemment fourni des données supportant l'hypothèse que l'estradiol prénatale pourrait être importante pour le contrôle respiratoire et métabolique des rats nouveaux-

nés [44], et nous avons démontré la présence de l'expression des récepteurs à l'estradiol dans les chémorécepteurs périphériques des rats mâles nouveaux-nés [1], supportant l'hypothèse d'un effet direct de l'estradiol à la fin du développement fœtal et/ou au début de la vie postnatale sur la fonction des corps carotidiens. Au cours de la présente étude, les rôles de l'estradiol, de la progestérone et de leur combinaison sur le développement du contrôle respiratoire chez le nouveau-né tenteront d'être mieux connus, car il a déjà été démontré que chez les rats adultes ces hormones jouaient un rôle de stimulant respiratoire.

### 1.5.1 Objectif général

Établir le rôle des sécrétions hormonales placentaires dans la maturation du système de contrôle respiratoire.

### 1.5.2 Objectifs spécifiques

- A) Tester l'hypothèse selon laquelle l'estradiol et la progestérone ont des effets synergiques au niveau du système de contrôle respiratoire du rat nouveau-né.
  - Est-ce que  $E_2$ , P et/ou  $E_2+P$  modulent le contrôle respiratoire et métabolique du raton à l'âge de 10 jours (P10)?
- B) Tester l'hypothèse selon laquelle les traitements postnataux à l'estradiol et à la progestérone ont des répercussions à long terme au niveau du système de contrôle respiratoire du rat adulte.
  - Est-ce que  $E_2$ , P et/ou  $E_2+P$  induisent une plasticité respiratoire ou métabolique chez les rats adultes à l'âge de 60 jours (P60)?
- C) Définir s'il existe des récepteurs à la progestérone et à l'estradiol dans le corps carotidien chez le rat nouveau-né et chez le rat adulte.

Note : l'article inséré au chapitre IV de ce mémoire permettra de répondre spécifiquement à cet objectif.

## 1.6 Hypothèses de recherche

A) Effets à court terme, animaux à P10 :

- L'hypothèse de travail propose que l'estradiol et la progestérone ont des effets synergiques au niveau du système de contrôle respiratoire chez le rat nouveau-né. Leur combinaison permettra une augmentation significative de la ventilation des animaux en situation hypoxique afin de mieux répondre à une diminution de la quantité d'O<sub>2</sub> disponible, démontrant ainsi l'effet synergique de l'E<sub>2</sub> et de la PR chez le nouveau-né.

B) Effets à long terme, animaux à P60 :

- Il est pensé que les traitements d'estradiol et de progestérone postnataux engendreront une plasticité du système de contrôle respiratoire à long terme. Par conséquent, nous supposons que la ventilation sera supérieure en normoxie et en hypoxie chez les animaux traités comparativement aux animaux contrôles.

C) Il existe des récepteurs à la progestérone et à l'estradiol au niveau du corps carotidien du raton nouveau-né et du rat adulte.

**CHAPITRE II :**

**MATÉRIELS**  
**&**  
**MÉTHODES**

## 2.1 Animaux utilisés

Cette étude a été réalisée sur des rats de souches Sprague Dawley mâles naissants et des femelles adultes de 2 à 3 mois (fournisseur : Charles Rivers, Montréal, Canada). Chaque rat n'a été utilisé qu'une seule fois au cours de ce protocole. Cette expérience a été approuvée par le comité d'éthique et de protection des animaux du Centre Hospitalier Universitaire du Québec (CPA-CHUQ) sous le titre; *effet d'une injection jumelée d'estradiol et de progestérone chez le raton sur le contrôle respiratoire*. Les rats avaient un libre accès à l'eau et à la nourriture et ont été acclimatés à des conditions de laboratoire standards (20°C, cycle de 12h jour/12h nuit; lumières allumées à 6:00 h et 18:00 h).

*Figure 4 : Mère et ses ratons*



La figure 4 ci-dessus démontre mère avec une pompe osmotique implantée en sous-cutanée qui est entrain d'allaiter ses bébés. La pompe osmotique contient les hormones stéroïdiennes (PR et E<sub>2</sub>) qui sont transmis aux ratons par le lait maternel.

## 2.2 Plan expérimental

Quatre groupes de rats ont été étudiés : les rats véhicules, les rats soumis au traitement d'estradiol, les rats soumis au traitement de progestérone et les rats soumis au traitement combiné d'estradiol et de progestérone. Les rats étaient soumis à leur traitement respectif en période néonatale du premier jour jusqu'au quatorzième jour après leur naissance.

Une fois les ratons nés, les portées ont été réduites à 12 animaux tout en conservant le maximum de mâles. Ils recevaient ensuite leur traitement respectif et puis à P10, la moitié des bébés mâles (par portée) étaient utilisés pour effectuer des mesures ventilatoires et métaboliques. Le jour suivant cette expérience ils étaient sacrifiés par surdose d'anesthésiant pour les prélèvements de leur corps carotidiens, de 2 ml de leur sang, de leurs poumons et de leurs glandes surrénales dans l'objectif de poursuivre ultérieurement l'étude par l'analyse de leurs tissus.

Les autres rats mâles recevaient quatre jours de traitement supplémentaire et grandissaient en compagnie de leur mère jusqu'à l'âge de leur sevrage. Suite à cette période, les rats mâles poursuivaient normalement leur croissance en groupe de deux à trois rats de la même portée par cage jusqu'à l'âge de sept semaines où une sonde thermique intra-abdominale leur était implantée sous anesthésie à l'isoflurane. Par la suite, les rats disposaient d'une semaine dans une cage individuelle afin de mieux surveiller leur récupération post-opératoire, de s'assurer que les rats continuaient à bien s'alimenter et qu'ils ne rongeaient pas leur plaie. Aussi ceci facilitait leur identification, ce qui était très important, car ils possédaient chacun une sonde exigeant un calibrage spécifique du pléthysmographe pour la mesure de leur température. Puis, à l'âge de 2 mois (P60) des mesures ventilatoires et métaboliques étaient effectuées. Le jour suivant cette procédure, ils étaient sacrifiés par surdose d'anesthésiant afin de poursuivre l'expérience par l'analyse de leurs tissus tel que chez les ratons (P10).

## **2.3 Choix du modèle expérimental**

Cette expérience a porté uniquement sur les rats mâles nés des mères traitées selon le protocole précédemment décrit. Ce choix avait pour objectif de simplifier l'expérience, car le taux d'hormones des rates adultes varie selon leur cycle menstruel. Étant donné que nous mesurons l'effet ces hormones stéroïdiennes, il aurait donc fallu que les mesures de ventilation et de métabolisme effectuées à cet âge soient toutes effectuées au même moment du cycle menstruel de la rate, ce qui aurait compliqué grandement l'expérience en ajoutant des sources de variation inter-sujets difficilement contrôlables.

## **2.4 Traitement des femelles lactantes aux hormones stéroïdiennes.**

Nous avons traité les mères avec des stéroïdes dans le but qu'il y ait transfert des hormones stéroïdiennes par le lait maternel afin d'augmenter la concentration d'hormones à laquelle sont normalement soumis les bébés ratons.

Pour chaque série d'expérience, les accouplements ont été effectués entre des rats mâles et des femelles vierges afin d'assurer la diversité génétique. Tous ces animaux étaient exposés aux mêmes conditions environnementales et aucun n'a été exposé à une autre forme de traitement ou de stress que ceux imposés par le présent protocole de recherche.

Les 14 femelles lactantes ont été séparées en quatre différents groupes, 3 femelles pour le groupe véhicule, 3 pour le groupe estradiol, et 4 pour chacun des 2 autres groupes. Soit un groupe véhicule, un groupe traité à la progestérone (PR) seule, un groupe traité à l'estradiol ( $E_2$ ) seule et un groupe traité à la progestérone et à l'estradiol. Nous avons utilisé des implants de micropompes osmotiques pour réaliser une infusion chronique d'hormones durant 14 jours. (Micropompe cat n° 2ML2, Alzet osmotic pumps Company, Cupertino, CA, USA.) L'implantation de la micropompe osmotique a été effectuée dans les 24 heures suivant la naissance de ses bébés et elle s'est faite sous anesthésie par isoflurane.

Le groupe véhicule a permis d'effectuer des comparaisons d'intérêts lors de l'analyse statistique des résultats. Le traitement dit contrôle ou véhicule consistait à remplir la micropompe d'une solution de glycérol  $C_3H_8O_3$  pure à 100% (compagnie : EM SCIENCE) préalablement stérilisée à l'autoclave durant 20 minutes. De sorte que la mère soit confrontée à stress physique comparable, en subissant la chirurgie pour l'implantation de la micropompe et en ayant l'injection continue sous-cutané d'un fluide étranger.

Voici les différents agents de remplissage de la pompe selon les groupes de traitement :

- 2 ml de glycérol → groupe véhicule
- 14 mg PR dans 2 ml de glycérol → groupe PR
- 100  $\mu$ g de  $E_2$  dans 2 ml de glycérol → groupe  $E_2$
- 14 mg PR avec 100  $\mu$ g de  $E_2$  dans 2 ml de glycérol → groupe PR+ $E_2$

La progestérone ( $C_{21}H_{30}O_2$ ) provient de la compagnie *US Biological* et l'estradiol (17-beta estradiol :  $C_{18}H_{24}O_2$ ) provient de la compagnie *SIGMA*, ces produits étaient conservés à 4°C. Les solutions étaient mixées la veille de l'implantation et laissées dans un incubateur à 37°C durant toute la nuit dans une solution stérile saline afin que la pompe se mette à fonctionner dès son implantation.

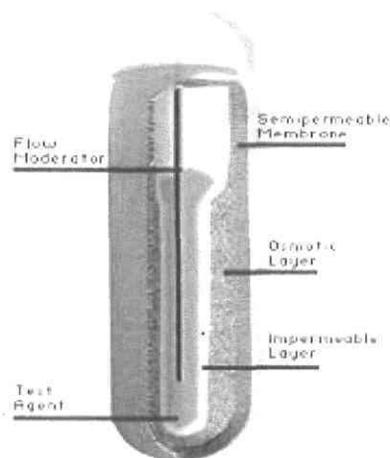
## 2.5 Avantages de l'utilisation des micropompes osmotiques :

Les micropompes osmotiques constituent une méthode fiable qui permettent de contrôler la libération d'hormones stéroïdiennes *in vivo*. Leur utilisation a permis d'assurer une exposition continue aux stéroïdes au niveau souhaité pour une période de 14 jours. De plus, il a été facile de les utiliser avec les animaux de laboratoire et cela a permis de réduire le stress imposé aux femelles lactantes en diminuant les manipulations. Les micropompes ont permis de réduire la variabilité expérimentale et d'assurer la reproductibilité des doses injectées.

## 2.6 Mode de fonctionnement des micropompes osmotiques :

Les pompes fonctionnent par différence de pression osmotique entre le compartiment interne de la pompe (salt sleeve) et le tissu environnant dans lequel est implantée la pompe. La haute osmolarité de la couche salée cause un flux d'eau vers la pompe passant par la membrane semi-perméable qui constitue la couche externe de la pompe. À mesure que l'eau entre dans la couche salée, le réservoir contenant la solution se comprime et la solution est ainsi éjectée à un taux prédéterminé ( $5\mu\text{l/h}$ ) dans l'animal.

*Figure 5 : Pompe osmotique*



Le taux de délivrance de la pompe est contrôlé par la perméabilité à l'eau de la couche externe de la membrane. Le volume délivré par la pompe, le taux de délivrance et le temps de délivrance sont fixés par le modèle de pompe choisi, l'agent de remplissage de la pompe utilisé et sa concentration.

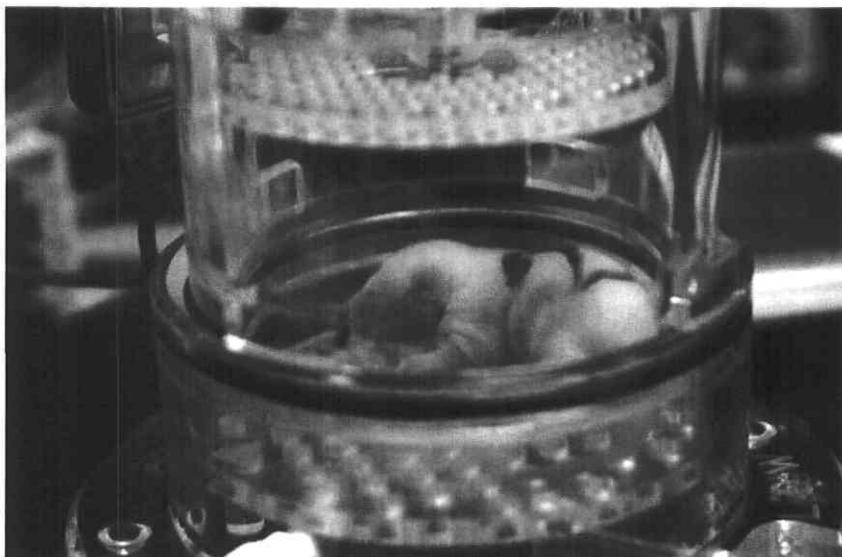
## 2.7 Méthode d'analyse du niveau hormonal sanguin

Lors de cette expérience, il était important de savoir si la concentration d'hormones stéroïdiennes était suffisante pour avoir une influence sur le niveau hormonal sanguin de la mère et de ses ratons. Nous avons donc pris des échantillons de sang à P11 chez les bébés (le jour de leur sacrifice) et le même jour nous avons prélevé  $500\mu\text{l}$  de sang chez la mère. Le prélèvement sanguin chez la mère s'est fait par la veine jugulaire, puis nous avons injecté une solution physiologique isotonique de remplacement sous-cutané. Nous avons ensuite fait analyser ces échantillons au laboratoire d'endocrinologie moléculaire du CHUL par la méthode de chromatographie en phase gazeuse.

Selon *Biologie et Multimédia - Université Pierre et Marie Curie - UFR de Biologie*, la méthode de chromatographie gazeuse permet de séparer des mélanges gazeux par suite d'équilibres entre une phase gazeuse mobile et une phase stationnaire qui peut être liquide (chromatographie de partage - **GLC**) ou solide (chromatographie d'adsorption - **GSC**). La méthode s'adresse à des molécules volatiles naturellement mais aussi à des molécules qui, par des réactions de dérivation, sont rendues volatiles à des températures ne provoquant pas leur décomposition.

## **2.8 Méthode de la pléthysmographie : enregistrements de la ventilation et du métabolisme**

*Figure 6 : Raton de 10 jours dans un pléthysmographe*



La pléthysmographie est la méthode de choix pour l'étude non traumatisante de la ventilation chez le rat. Elle consiste à enregistrer les changements de pression dans la chambre, lesquels sont générés durant la respiration. En fait, comme l'air inspiré est réchauffé et humidifié des valeurs ambiantes aux valeurs pulmonaires, la pression totale dans l'enceinte augmente et l'inverse se produit durant l'expiration.

Rendus à l'âge de **10 jours** ou de **2 mois** les ratons mâles des mères ayant subi divers traitements hormonaux ont été utilisés pour réaliser des mesures ventilatoires et métaboliques par pléthysmographie. Les variables analysées sont les suivantes :

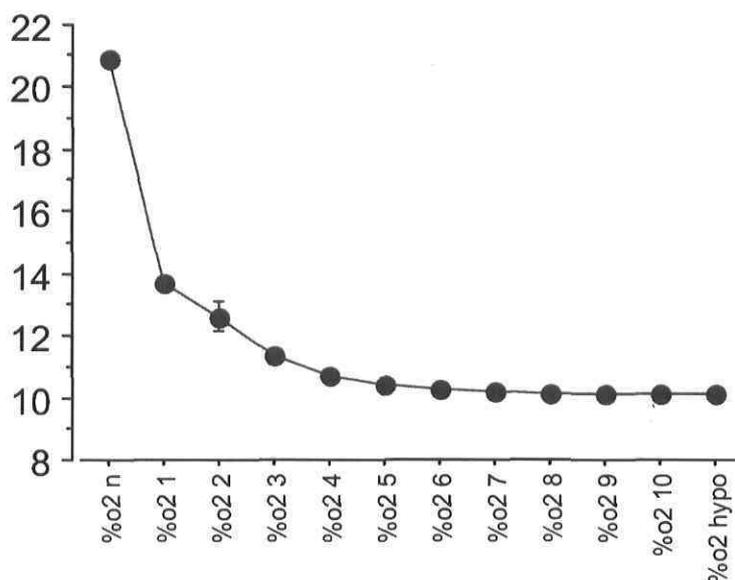
- **Ve (ventilation) = FR x Vt**      - **VCO<sub>2</sub> (métabolisme)**
- **température corporelle**      - **Δ % O<sub>2</sub> (hypoxie)**

Les mesures ont été effectuées sur l'animal en état d'éveil et non-contraint. Le poids de l'animal a été noté au début de l'expérience. La température rectale des rats âgés de 10 jours a été prise avant le début de l'expérience et à la fin de l'expérience. Une sonde intra-abdominale contenant un transmetteur télémétrique (PDT-4000, Mini-Mitter, Bend, OR, USA) a permis de mesurer constamment la température des rats adultes tout au long des enregistrements respiratoires en passant par un receveur Er-4000 Energizer/Receiver (Mini-Mitter).

Les enregistrements respiratoires ont été réalisés à l'aide d'un pléthysmographe (Emka Technologies, Paris, France) en utilisant une méthode dérivée de celle décrite par Bartlett et Tenney [55], avec des chambres de différentes grosseurs pour les bébés et les adultes. La chambre Emka permettait les mesures du flux relatif des échanges gazeux respiratoires à l'intérieur de la chambre. Le système avait préalablement été calibré en injectant dans la chambre un volume de 5 ml pour les adultes ou de 1 ml pour les bébés à l'aide d'une seringue de plastique. Les chambres d'enregistrements étaient alimentées par un débit constant d'air ambiant ou d'un mélange hypoxique gazeux contenant 99 % d'azote. Le débit d'air de la chambre était de 600 à 700 ml/mn pour les bébés et de 900 à 1000 ml/mn pour les adultes. Les senseurs d'oxygène (AEI technologies, modèle N-37M) étaient calibrés quotidiennement avant chaque expérience à l'aide de mélanges gazeux dont la concentration des composantes était connue. La pression barométrique, la température et le degré d'humidité à l'intérieur de la chambre étaient constamment surveillés et ils ont été notés au début et à la fin de chaque expérimentation. Ceci a permis la correction du volume courant selon l'équation standard après l'intégration du signal par le logiciel Emka [44].

L'animal prenait place dans une chambre d'enregistrement en plexiglas dans laquelle il était libre de se déplacer. Lorsque l'animal était calme, après une période d'exploration de la cage de 30 à 45 minutes, l'enregistrement pouvait commencer. Après les 10 premières minutes d'enregistrement en normoxie nous introduisons le mélange gazeux contenant 99 % d'azote dans la chambre afin de diminuer la concentration d'O<sub>2</sub> à 10 % et ce durant 30 minutes. Tous les signaux de la ventilation et du métabolisme ont été conservés sur un ordinateur afin de les analyser. Suite à cette exposition, l'animal était euthanasié par surdose d'anesthésiant pour prélèvement des tissus.

**Figure 7 : Variation de la concentration d'oxygène en fonction du temps**



La figure 7 ci-dessus démontre graphiquement la variation de la concentration d'oxygène dans la chambre du pléthysmographe. Après son adaptation à son nouvel environnement, les paramètres ventilatoires et métaboliques de l'animal sont enregistrés durant 40 minutes, les 10 premières minutes en normoxie, suivi de 30 minutes en situation d'hypoxie à 10 % O<sub>2</sub>. Les différents paramètres étaient enregistrés à chaque minute durant les 40 minutes. Le premier point sur le graphique représente la moyenne des 10 minutes de la normoxie afin de trouver la valeur qui se rapproche le plus possible de la vraie valeur de repos de

l'animal. Les dix points suivant sur le graphique représentent la moyenne des valeurs pour une minute durant les dix premières minutes de la situation d'hypoxie. Puis, le dernier point sur le graphique qui représente la moyenne des cinq dernières minutes de situation d'hypoxie. Ces enregistrements nous permis de suivre l'évolution de la réponse à l'hypoxie et aussi de pouvoir effectuer une comparaison entre la situation de normoxie et en hypoxie.

## 2.9 Unités des paramètres mesurés au pléthysmographe

BW : poids en grammes (g)

T° : température en °C

FR : fréquence respiratoire en  $c \cdot \text{min}^{-1}$  (c = cycle)

Vt : volume courant en ml BTPS/100g ; correspond à la portion de l'air qui est inspirée à chaque respiration.

Ve : ventilation en ml BTPS/100g/mn

VCO<sub>2</sub> : volume produit de CO<sub>2</sub> en ml ATPS/100g/mn

Les données du volume courant et de la ventilation ont été standardisés en ml BTPS, ce qui indique que les volumes pulmonaires ont été normalisés à la température corporelle et à un niveau d'humidité saturé. De plus, le VCO<sub>2</sub> a été mesuré en ml ATPS indiquant que la mesure a été effectuée à température ambiante et à un niveau d'humidité saturé.

## 2.10 Méthode d'analyse statistique

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel Stat View version 5.0.0.0. Nous avons planifié nos comparaisons à priori; l'objectif étant de comparer les trois traitements au traitement véhicule. Le test du LSD utilisé à priori a permis de déterminer les traitements qui diffèrent significativement ( $\alpha = 0.05$ ) du traitement véhicule. Les barres d'erreurs sur les graphiques de la section des résultats correspondent à  $\pm 1$  erreur standard.

# **CHAPITRE III :**

# **RÉSULTATS**

### 3.1 PREMIÈRE PARTIE DES RÉSULTATS:

#### Dosage du sérum sanguin

Tableau 1 :

##### A : Dosage chez les mères

Échantillon (mère)	Nombre	Estradiol pg/ml	Progestérone ng/ml
Véhicule	1	< 5.00	49.1
Estradiol (E <sub>2</sub> )	1	57.68*	34.4
Progestérone (PR)	1	< 10.00	74.5*
E <sub>2</sub> +PR	1	40.68*	14.3*

##### B : Dosage chez les rats

Échantillon (rats P10)	Nombre	Estradiol ng/ml	S.E.M. ng/ml	Progestérone ng/ml	S.E.M. pg/ml
Véhicule	12	0.13	0.03	0.48	0.3
Estradiol (E <sub>2</sub> )	12	0.13	0.02	0.52	0.4
Progestérone (PR)	12	0.11	0.05	1.21*	0.4
E <sub>2</sub> +PR	12	0.21*	0.03	1.03*	0.2

##### Légende :

Les tableaux ci-haut rapportent les valeurs obtenues pour le dosage du sérum sanguin effectué auprès des mères (A) et de leurs rats (B) recevant les différents traitements par micropompe osmotique. On y retrouve les quantités d'estradiol et de progestérone détectées.

\* indiquent les valeurs significativement différentes ( $P < 0.05$ ) comparativement à la valeur du groupe des animaux véhicules en utilisant le test de PLSD de Fisher.

Au tableau A, le dosage sanguin a été effectué auprès d'une seule mère par traitement. Au tableau B, la concentration sanguine d'estradiol et de progestérone a été obtenue auprès d'une portée contenant des animaux mâles et femelles pour chacun des quatre traitements. Les analyses rapportées aux tableaux ci-haut ont permis de vérifier la fonctionnalité des micropompes. Plusieurs études ont déjà utilisé la technique des micropompes osmotique pour effectuer une exposition aux stéroïdes [56] [57]. L'analyse du sérum sanguin nous a permis de valider la diffusion des stéroïdes de la mère aux rats par l'intermédiaire du lait maternel. Nos résultats ont démontré une augmentation significative de progestérone plasmatique, alors que nous n'avons pas retrouvé d'augmentation de l'estradiol plasmatique chez les P10. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'une injection de faible dose d'estradiol

chez les rats nouveaux-nés produit une rapide accumulation de radioactivité dans les noyaux cellulaires des tissus cibles, incluant le système nerveux central, et 95% de cette activité circulante est retrouvée en tant qu'estrone. Ceci indique une transformation rapide de l'estradiol plasmatique chez les rats nouveaux-nés [58]. En somme, ces résultats ont démontré que la dose d'hormones par micropompe était suffisante pour provoquer un changement de la concentration de stéroïdes du sérum sanguin des mères et affecter les ratons. Nous avons conservé les mêmes dosages de stéroïdes pour toute la durée de l'étude.

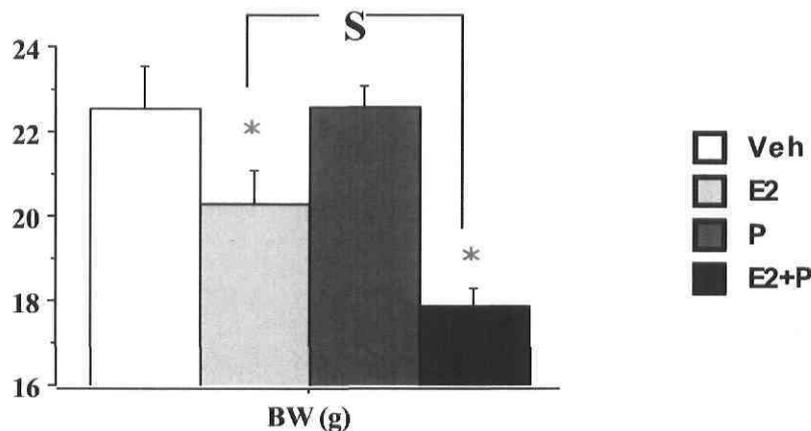
## **3.2 DEUXIÈME PARTIE DES RÉSULTATS:**

### **Effets à court terme des suppléments d'estradiol et de progestérone : analyse du raton de 10 jours**

#### **3.2.1 Poids des ratons de 10 jours**

Les ratons du groupe véhicule (n=12) pèsent en moyenne  $22.5 \pm 1.0$  g, ceux du groupe estradiol (n=10)  $20.8 \pm 0.8$  g et ceux du groupe E<sub>2</sub>+P (n=13) pèsent  $17.9 \pm 0.5$  g. Le poids des ratons est influencé par le traitement contenant de l'estradiol; les ratons pèsent en moyenne 2 g de moins que les ratons véhicule. De plus, le traitement combiné semble avoir un effet plus grand sur la variation du poids des animaux; ils pèsent en moyenne  $17.9 \pm 0.4$  g, donc 4.6 g de moins que les ratons du groupe véhicule. La progestérone seule n'influence pas significativement le poids des animaux. L'estradiol influence négativement la croissance des ratons et davantage en présence de progestérone. De plus, une ANOVA et le test PLSD de Fisher nous ont démontré que l'effet du traitement combiné est significativement plus grand que celui contenant seulement de l'estradiol (valeur p = 0.018). E<sub>2</sub> et PR ont donc un effet synergique pour le poids des ratons de 10 jours.

**Figure 8 : Poids des rats de 10 jours**



**Figure 8 :** Effet d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur le poids en gramme (g) des rats. Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indiquent les valeurs significativement différentes ( $Pr < 0.05$ ) comparativement à la valeur du groupe des animaux véhicules.

S indique que les deux groupes ont des valeurs significativement différentes ( $Pr < 0.05$ ).

### 3.2.2 Enregistrements en normoxie des rats de 10 jours

#### Utilisation des facteurs allométriques

Il existe une différence de poids importante entre les animaux du groupe véhicule et ceux traités à l'estradiol ou au traitement combiné. Nous observons cette différence de poids autant entre les rats de 10 jours (fig.8) que les adultes de 2 mois (fig.11). Comparativement aux rats de masse corporelle plus élevée, les plus petits rats requièrent des plus hauts taux métaboliques pour leur thermorégulation car ils possèdent un ratio plus élevé de surface corporelle / masse corporelle. Avec l'utilisation des facteurs allométriques, la correction des résultats pour la ventilation et la production de  $CO_2$  nous a permis de tenir compte de cette différence de poids et de son impact sur le métabolisme lors du calcul des résultats. Nous avons donc calculé la  $VCO_2$ , la VE et le  $V_t$  en tenant compte de la variation du poids en situation de normoxie;  $VCO_2 * BW^{-0.52}$ ,  $VE * BW^{-0.47}$ ,  $V_t * BW^{-0.47}$  et aussi en situation hypoxique;  $VCO_2 * BW^{-0.68}$ ,  $VE * BW^{-0.62}$ ,  $V_t * BW^{-0.62}$ . Parce qu'en hypoxie les rats

de plus petite taille diminuent d'avantage leur taux métabolique, l'échelle prenant en compte les facteurs allométriques varient selon la situation de normoxie ou d'hypoxie. Cette échelle a été utilisée selon les travaux de Mortola [59]. Voir les tableaux 2 et 3 pour les P10, les tableaux 4 et 5 pour les P60.

### **Température (fig.9A)**

En situation normoxique, la température des rats est influencée significativement par les deux traitements contenant de l'estradiol. Elle est 1 °C plus faible chez les rats ayant subi le traitement d'estradiol ( $34.3 \pm 0.4$  °C) et de même en ce qui a trait aux rats du groupe combiné d'E<sub>2</sub> et de PR ( $33.9 \pm 0.3$  °C) comparativement au groupe véhicule ( $35.2 \pm 0.3$  °C).

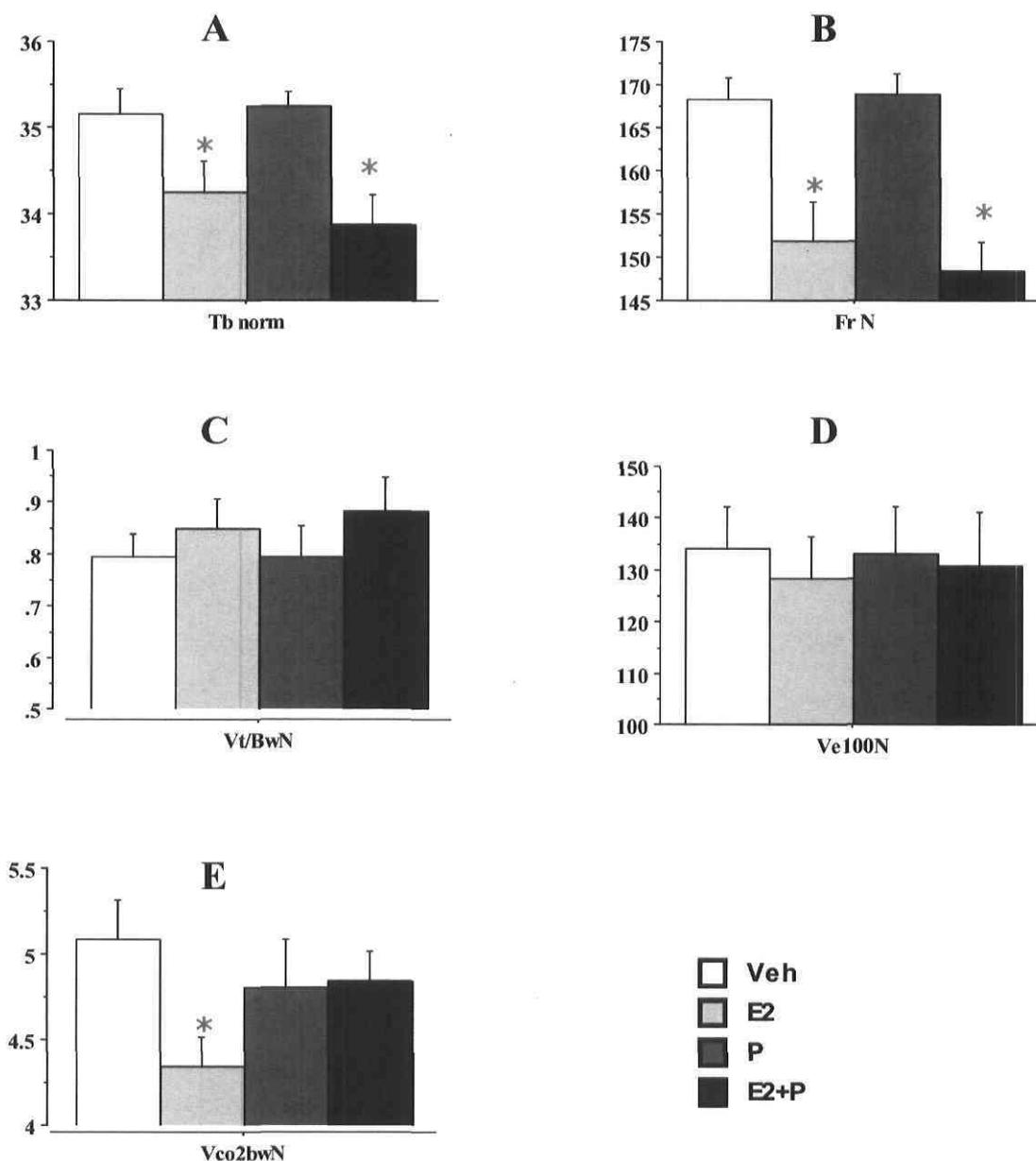
### **Fréquence respiratoire (fig. 9B)**

La fréquence respiratoire des animaux estradiols et ceux du traitement combiné est significativement inférieure de 14 à 2 c·min<sup>-1</sup> respectivement par rapport aux animaux véhicules. Tandis que la progestérone n'affecte pas la fréquence respiratoire, celle des animaux véhicules et progestérones demeure en moyenne à  $169 \pm 2$  c·min<sup>-1</sup>.

### **Volume courant (fig.9C)**

Le volume courant des animaux traités avec de l'estradiol, de la progestérone ou de l'estradiol + progestérone ne diffère pas significativement du Vt des animaux du traitement véhicule. La valeur pour les animaux véhicules étant en moyenne  $0.18 \pm 0.01$  ml BTPS/100g.

**Figure 9 : Rats âgés de 10 jours en situation normoxique**



**Figure 9 :** Effet d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur **A** : la température rectale en °C, **B** : la fréquence respiratoire en c·min<sup>-1</sup>, **C** : le volume courant en ml BTPS/100g, **D** : la ventilation en ml BTPS/100g/mn et **E** : la production de CO<sub>2</sub> en ml ATPS/100g/mn. Ces valeurs correspondent à une situation normoxique pour des rats âgés de 10 jours. Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indiquent les valeurs significativement différentes (Pr < 0.05) comparativement à la valeur du groupe des animaux véhicules.

### **Ventilation (fig.9D)**

Il n'y a pas de différence significative de la ventilation entre les animaux traités et les animaux véhicules. La ventilation moyenne brute des rats véhicules est de  $134 \pm 8$  ml BTPS/100g/mn. En faisant l'analyse des données avec la correction pour les facteurs allométriques (tableau 2), il n'y a toujours pas de différences significatives entre les traitements.

### **Production de CO<sub>2</sub> (fig. 9E)**

Pour l'analyse des données brutes, la production de CO<sub>2</sub> des rats traités à l'estradiol ( $4.5 \pm 0.3$  ml ATPS/mn/100g) est significativement inférieure au groupe des animaux véhicules ( $5.1 \pm 0.2$  ml ATPS/mn/100g). Lors de la correction des résultats pour les facteurs allométriques (tableau 2) nous confirmons la différence significative entre les animaux véhicules et les animaux estradiol comme c'est le cas avec les données brutes. De plus, il y a une différence significative entre les animaux véhicules et ceux du groupe estradiol + progestérone. Le métabolisme de repos des animaux traités à l'estradiol ou avec le traitement combiné est inférieur au métabolisme des animaux véhicules.

#### **Points importants :**

- 1) Les ratons des mères ayant été traitées à l'estradiol ou au traitement combiné ont un poids inférieur.**
- 2) L'estradiol apparaît comme étant un facteur de réduction du métabolisme, de la fréquence respiratoire et de la thermorégulation de base.**

**Tableau 2 :** Résultats avec correction pour les facteurs allométriques des rats nouveaux-nés en situation normoxique.

Variables	Traitements			
	Véhicule	Estradiol	Progestérone	E <sub>2</sub> + PR
<b>Vt/BW</b> ml BTPS/kg <sup>0.47</sup>	1.05 ± 0.05	1.07 ± 0.06	1.06 ± 0.07	1.05 ± 0.08
<b>Ve</b> ml BTPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.47</sup>	178 ± 10	161 ± 10	177 ± 11	155 ± 13
<b>VCO<sub>2</sub></b> ml ATPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.52</sup>	8.2 ± 0.3	6.7 ± 0.3*	7.8 ± 0.4	7.0 ± 0.3*

**Légende :**

\* indique les résultats qui sont significativement différents (Pr<0.05) des résultats du groupe véhicule avec le test du LSD utilisé a priori.

### 3.2.3 Enregistrements en hypoxie des rats de 10 jours

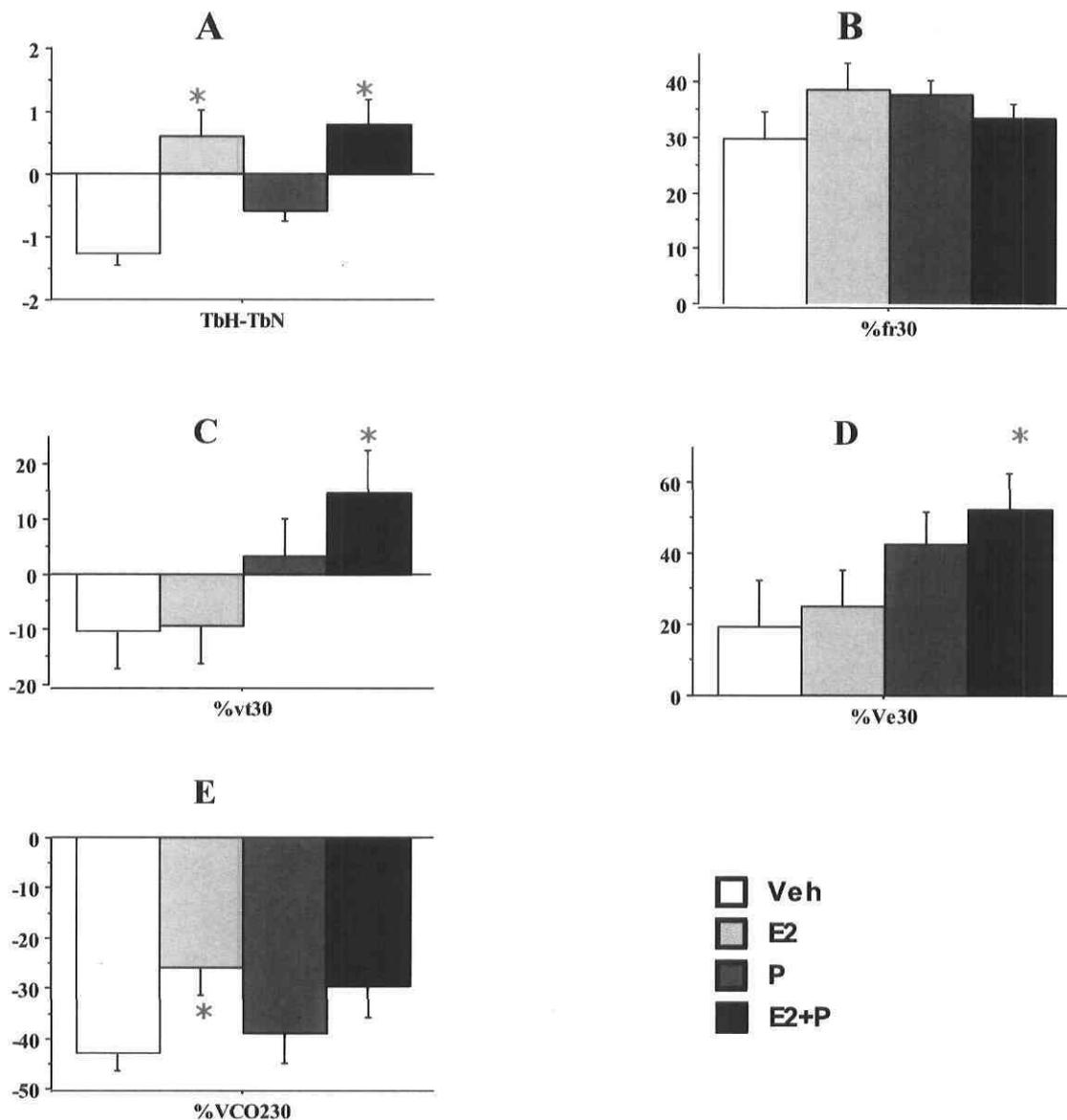
#### Différence de température entre la normoxie et l'hypoxie ( fig.10A)

La température des animaux véhicules et ceux traités avec la progestérone chute avec l'exposition en hypoxie ( $-1.3 \pm 0.2$  et  $-0.6 \pm 0.2$  °C respectivement). Par contre, les groupes E<sub>2</sub> et E<sub>2</sub>+PR réagissent différemment en maintenant ou en augmentant faiblement leur température durant la période hypoxique.

#### Fréquence respiratoire (fig.10B)

La fréquence respiratoire des animaux traités ne diffère pas significativement de celle des rats du groupe véhicule. Ce dernier ayant une fréquence respiratoire moyenne de  $217 \pm 7$  c·min<sup>-1</sup>.

**Figure 10 : Rats âgés de 10 jours en situation hypoxique**



**Figure 10 :** Effet d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur les réponses relatives (% vs normoxie, sauf pour le graphique A) **A** : différence entre la température rectale en hypoxie et celle en normoxie en °C, **B** : la fréquence respiratoire en %, **C** : le volume courant en %, **D** : la ventilation en % et **E** : la production de CO<sub>2</sub> en %. Ces valeurs correspondent à une situation hypoxique pour des rats âgés de 10 jours. La situation hypoxique est de 30 mn. à O<sub>2</sub>=10%. Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indique les traitements qui diffèrent significativement du traitement véhicule (Pr<0.05).

### **Volume courant ( fig.10C)**

Il apparaît que les animaux véhicules et ceux du groupe estradiol diminuent leur volume courant lors de l'exposition à l'hypoxie. Tandis que les animaux progestérones le maintiennent. Ceux du groupe E<sub>2</sub>+PR, modifient leur Vt positivement en présence d'une quantité réduite d'oxygène. L'augmentation de leur volume courant entraînerait donc l'augmentation de leur ventilation ( $V_e = V_t \times FR$ ).

### **Ventilation (fig.10D)**

Seul le pourcentage d'augmentation de ventilation des animaux du groupe E<sub>2</sub>+PR est significativement supérieur à celui du groupe véhicule. Le graphique nous laisse croire à un effet additif de la réponse de l'estradiol et de la progestérone. Séparément, l'estradiol et la progestérone ont peu d'effet sur le pourcentage d'augmentation de la ventilation des animaux en situation hypoxique, mais en traitement combiné leur impact est visible. Effectivement, l'augmentation de la réponse ventilatoire du groupe E<sub>2</sub>+P atteint  $52.6 \pm 10.0$  % en moyenne alors que le groupe véhicule atteint une augmentation moyenne de  $19.5 \pm 13.0$  % par rapport à la ventilation initiale en normoxie.

Lors de l'analyse des données avec correction pour les facteurs allométriques (tableau 3), nous observons une ventilation significativement supérieure chez les animaux du groupe progestérone ( $434 \pm 23$  ml BTPS/mn/kg<sup>0.62</sup>), de même que ceux ayant reçu le traitement combiné ( $413 \pm 17$  ml BTPS/mn/kg<sup>0.62</sup>) comparativement aux véhicules ( $357 \pm 20$  ml BTPS/mn/kg<sup>0.62</sup>).

### **Production de CO<sub>2</sub> ( fig.10E)**

Le métabolisme des animaux E<sub>2</sub> diminue significativement moins que celui des animaux véhicules ou ceux traités avec la progestérone. Effectivement, les animaux véhicules diminuent leur production de CO<sub>2</sub> à l'hypoxie de  $-43.0 \pm 4.2$ % en moyenne par rapport à la situation normale, alors que ceux traités à l'estradiol diminuent leur production de CO<sub>2</sub> de  $28.5 \pm 3.3$ %.

En analysant les données avec la correction pour les facteurs allométriques (tableau 3), nous obtenons que les valeurs de  $VCO_2$  sont significativement supérieures pour les animaux du traitement combiné ( $9.7 \pm 0.5$  ml ATPS/min/kg<sup>0.68</sup>) et ceux du traitement à la progestérone ( $9.5 \pm 0.2$  ml ATPS/min/100g) comparativement à ceux du groupe véhicule ( $7.8 \pm .4$  ml ATPS/min/kg<sup>0.68</sup>).

### Points importants :

- 1) L'estradiol abolie la réponse thermique à l'hypoxie en augmentant légèrement la température des rats.
- 2) À l'hypoxie, la progestérone permet une augmentation supérieure de la ventilation et du métabolisme comparativement aux animaux véhicules.

**Tableau 3 :** Données brutes des résultats des rats nouveaux-nés en hypoxie et résultats avec la correction pour les facteurs allométriques.

	Variables	Traitements			
		Véhicule	E <sub>2</sub>	PR	E <sub>2</sub> +PR
Données brutes	Temp. °C	33.8 ± 0.3	34.9 ± 0.3*	34.7 ± 0.2*	34.7 ± 0.2*
	FR c min <sup>-1</sup>	218 ± 7	210 ± 9	233 ± 5	198 ± 6*
	Vt/BW ml BTPS/100g	0.68 ± 0.03	0.74 ± 0.04	0.79 ± 0.05 p=0.066	0.97 ± 0.05*
	Ve/BW ml BTPS/mn/100g	150 ± 24	154 ± 27	183 ± 34*	191 ± 30*
	VCO <sub>2</sub> /BW ml ATPS/100g/mn	2.82 ± 0.06	3.13 ± 0.12 p=0.067	2.76 ± 0.14	3.16 ± 0.22
Données corrigées	Vt/BW ml BTPS/kg <sup>0.62</sup>	1.63 ± 0.06	1.67 ± 0.08	1.88 ± 0.11 p=0.059	2.11 ± 0.10*
	Ve/BW ml BTPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.62</sup>	357 ± 20	349 ± 19	434 ± 23*	413 ± 17*
	VCO <sub>2</sub> /BW ml ATPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.68</sup>	7.8 ± 0.4	8.6 ± 0.3	9.5 ± 0.2*	9.7 ± 0.5*

#### Légende :

\* indique les résultats qui sont significativement différents (Pr<0.05) des résultats du groupe véhicule avec le test du LSD utilisé a priori. Les valeurs du LSD pour les résultats qui se rapprochent du seuil accepté sont écrites.

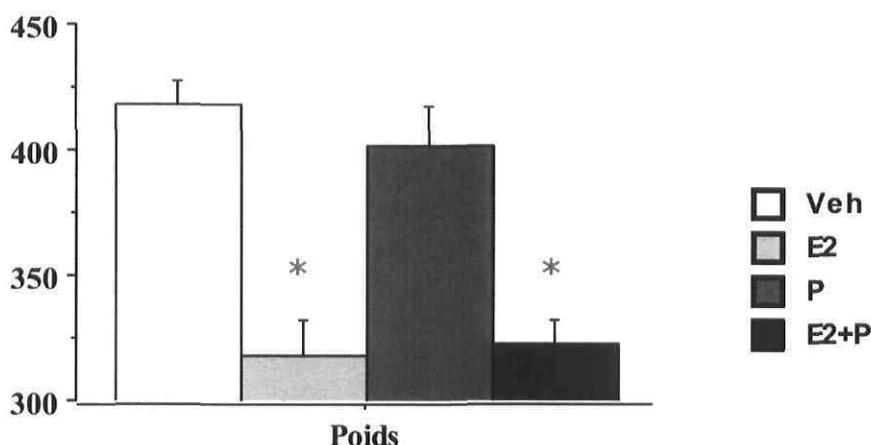
### 3.3 TROISIÈME PARTIE DES RÉSULTATS:

#### Effets à long terme des suppléments d'estradiol et de progestérone : analyse du rat à 2 mois

##### 3.3.1 Poids des animaux de 2 mois

Les résultats démontrent que les animaux traités en bas âge avec de l'estradiol (n=14) ou une combinaison d'estradiol et de progestérone (n=14) sont beaucoup moins pesants que les animaux véhicules (n=15) et ceux du groupe progestérone seulement (n=9). Les animaux estradiols pèsent en moyenne 101 g de moins et les animaux E<sub>2</sub>+P pèsent 95 g de moins en moyenne que les animaux du groupe véhicule.

*Figure 11 : Poids des animaux de 2 mois*



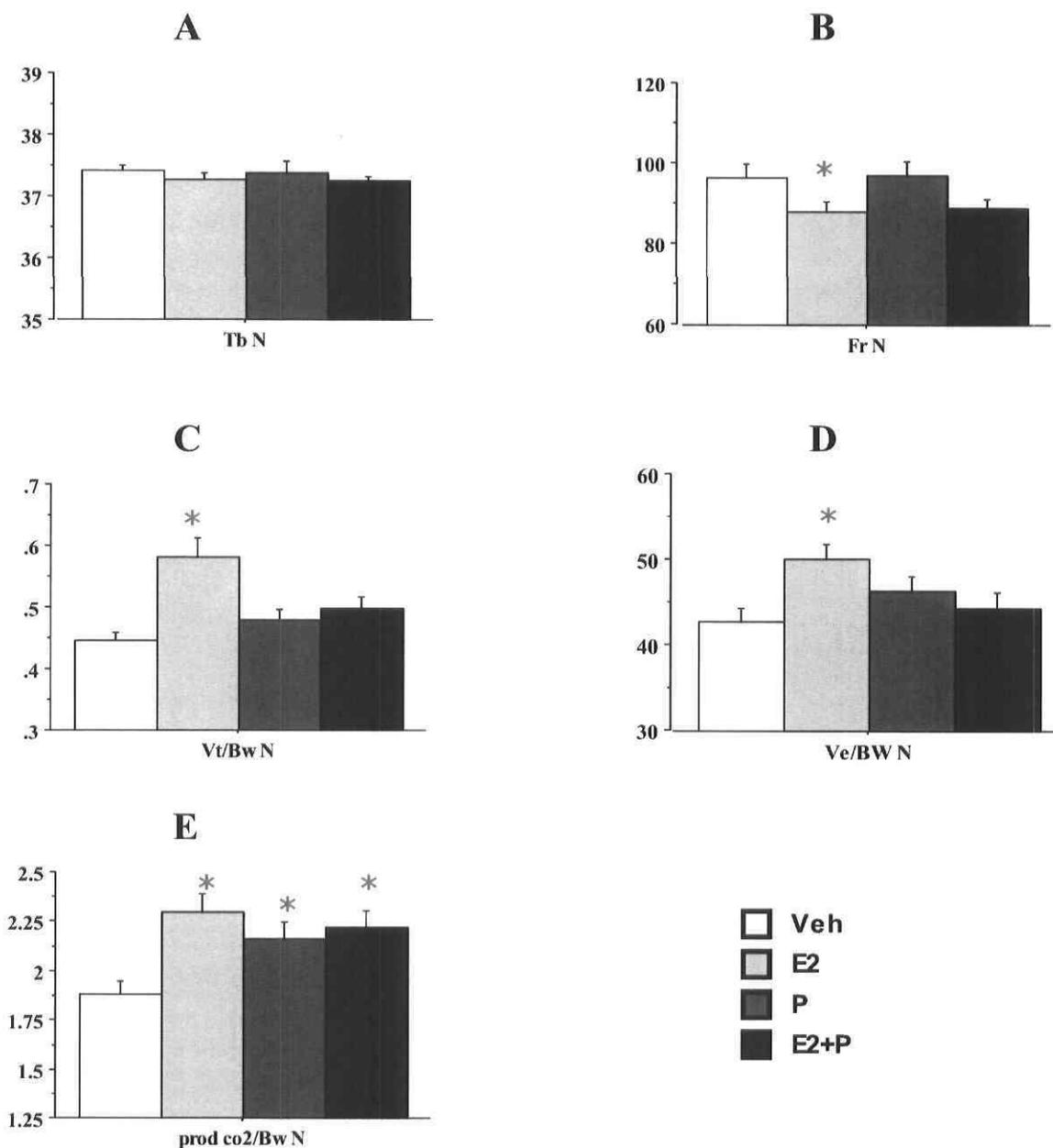
*Figure 11* : Effet d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur le poids des rats de 2 mois en gramme (g). Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indiquent les valeurs significativement différentes ( $Pr < 0.05$ ) comparativement à la valeur du groupe des animaux véhicules.

#### Point important :

- 1) La différence de poids observée à l'âge de dix jours est toujours apparente à l'âge adulte.

**Figure 12 : Résultats des rats âgés de 2 mois et ayant été traités durant 2 semaines postnatales aux hormones stéroïdiennes en situation normale**



**Figure 12 :** Effet à long terme d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur **A** : la température en °C, **B** : la fréquence respiratoire en c·min<sup>-1</sup>, **C** : le volume courant en ml BTPS/100g, **D** : la ventilation en ml BTPS/100g/mn et **E** : la production de CO<sub>2</sub> en ml ATPS/100g/mn. Ces valeurs correspondent à une situation en normoxie pour des rats âgés de 2 mois. Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indique les traitements qui diffèrent significativement du traitement véhicule (Pr < 0.05).

### 3.3.2 Enregistrements en normoxie des rats de 2 mois

#### Température des rats de 2 mois (fig.12A) :

Il n'y a pas de différence significative de la température interne des rats adultes ayant eu un traitement stéroïdiens durant leurs deux premières semaines de vie par rapport à ceux du groupe véhicule. La température moyenne du groupe véhicule est de  $37.4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ .

#### Fréquence respiratoire des rats de 2 mois (fig.12B) :

En utilisant le test du LSD à priori, la fréquence respiratoire des rats adultes traités à l'estradiol en période néonatale diffère significativement des rats véhicules du même âge. La fréquence respiratoire moyenne des rats véhicules est de  $96 \pm 4 \text{ c}\cdot\text{min}^{-1}$  tandis que celle des animaux traités à l'estradiol est de  $88 \pm 3 \text{ c}\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### Volume courant des rats de 2 mois (fig.12C) :

Les animaux traités à l'estradiol démontrent un volume courant significativement supérieur aux animaux véhicules. Le  $V_t$  du groupe estradiol est en moyenne de  $0.58 \pm 0.03 \text{ ml BTPS}/100\text{g}$ , tandis que celui des véhicules est de  $0.45 \pm 0.01 \text{ ml BTPS}/100\text{g}$ . Les autres groupes de traitements n'ont pas d'effet significatif sur le volume courant des animaux adultes.

#### Ventilation des rats de 2 mois (fig.12D) :

Les données brutes indiquent que la ventilation des rats véhicules est en moyenne de  $43 \pm 2 \text{ ml BTPS}/\text{mn}/100\text{g}$  et que la ventilation des rats du groupe de traitement à l'estradiol ( $50 \pm 2 \text{ ml BTPS}/\text{mn}/100\text{g}$ ) est significativement différente de la ventilation des rats véhicules. Lors de l'analyse des données avec la correction pour les facteurs allométriques (tableau 4) aucune différence significative n'est notée entre les groupes de traitement véhicule et estradiol. Par contre, la correction des données nous permet déterminer que la ventilation

des animaux du traitement combiné est significativement inférieure à celle des animaux véhicules.

**Production de CO<sub>2</sub> des rats de 2 mois (fig.12E) :**

L'analyse des données brutes telle que représentée sur la figure 5E nous indique que la production de CO<sub>2</sub> des rats est significativement plus élevée pour les trois groupes d'animaux traités aux hormones stéroïdiennes en situation normoxique comparativement aux véhicules. La production de CO<sub>2</sub> des véhicules est de  $1.88 \pm 0.07$  ml ATPS/mn/100g. Celle des animaux estradiols est de  $2.30 \pm 0.09$  ml ATPS/mn/100g. Pour le groupe progestérone la production de CO<sub>2</sub> est de  $2.16 \pm 0.09$  ml ATPS/mn/100g. Les animaux du traitement combiné d'estradiol et de progestérone ont une production de CO<sub>2</sub> moyenne de  $2.22 \pm 0.09$  ml ATPS/mn/100g.

En ce qui a trait à l'analyse des résultats avec les données corrigées pour tenir compte des facteurs allométriques (tableau 4) , nous obtenons une différence significative seulement entre le groupe véhicule et le groupe progestérone en effectuant un LSD à priori.

**Points importants :**

- 1) Le traitement combiné diminue la ventilation de base des rats adultes.**
- 2) L'exposition à la progestérone en bas âge augmente le métabolisme du rat adulte.**

**Tableau 4 :** Résultats avec correction pour les facteurs allométriques des adultes en situation normoxique.

Variables	Traitements			
	Véhicule	Estradiol	Progestérone	E <sub>2</sub> + PR
<b>Vt/BW</b> ml BTPS/kg <sup>0.47</sup>	2.79 ± .07	3.15 ± .16*	2.96 ± .11	2.72 ± .09
<b>Ve</b> ml BTPS·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.47</sup>	266 ± 9	271 ± 10	285 ± 8	241 ± 10*
<b>VCO<sub>2</sub></b> ml ATPS·min <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.52</sup>	12.3 ± 0.4	13.2 ± 0.5	13.9 ± 0.5*	12.8 ± 0.4

**Légende :**

\* indique les résultats qui sont significativement différents (Pr<0.05) des résultats du groupe véhicule avec le test du LSD utilisé à priori.

### 3.3.3 Enregistrements en hypoxie des rats âgés de 2 mois

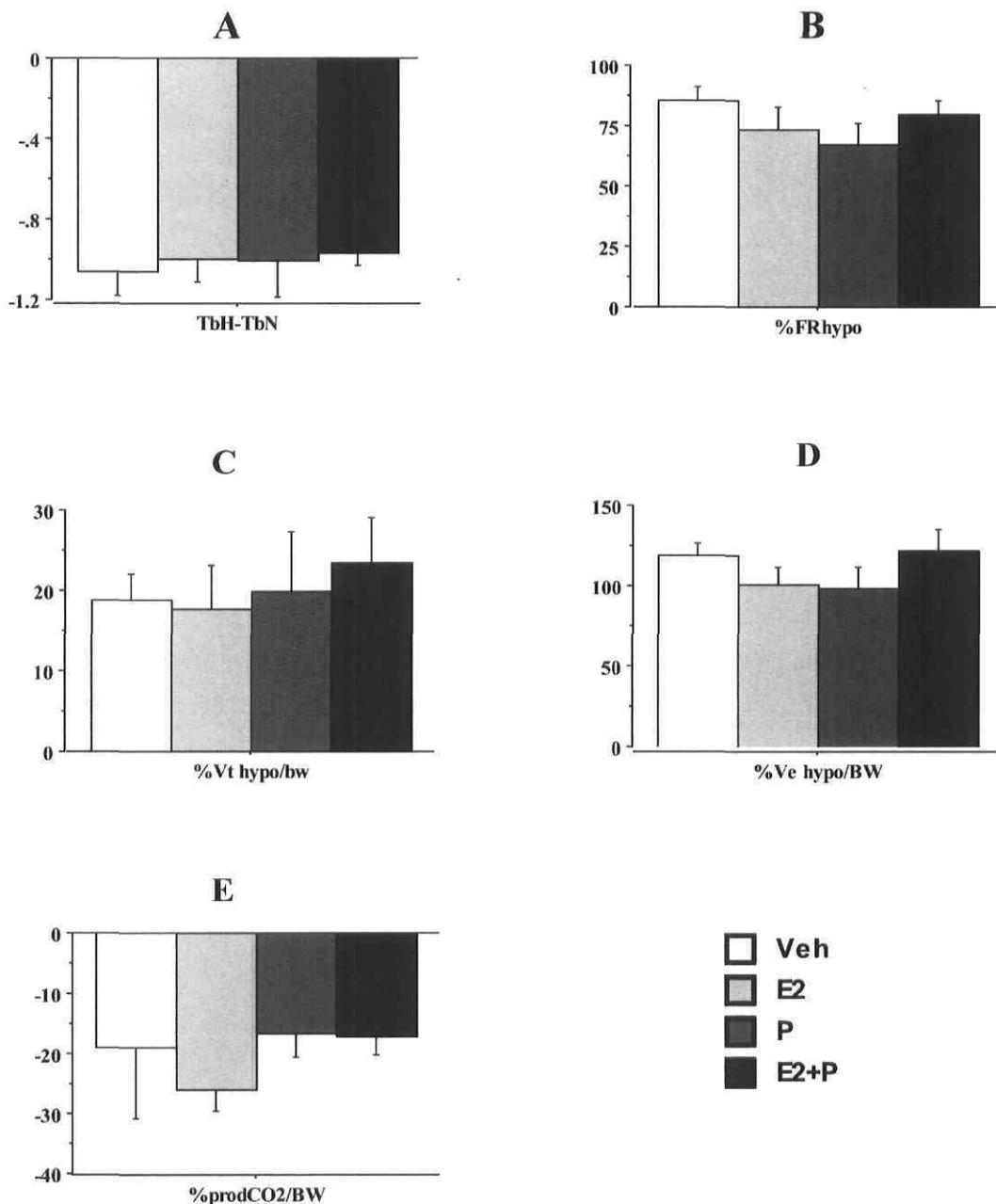
**Température des rats de 2 mois (fig.13A) :**

Il n'y a pas de différence significative de la température interne des rats adultes ayant eu un traitement stéroïdien durant les deux premières semaines de leur vie comparativement aux animaux véhicules. Les rats diminuent tous leur température pour atteindre une température globale moyenne de 36.3 ± 0.1 °C lors de la situation hypoxique.

**Fréquence respiratoire des rats de 2 mois (fig.13B) :**

Le pourcentage d'augmentation de la fréquence respiratoire en hypoxie des rats de 2 mois traités aux stéroïdes ne diffère pas significativement de celui des animaux véhicules. La fréquence respiratoire moyenne des animaux véhicules est de 176 ± 6 c·min<sup>-1</sup>. Par contre, les animaux traités à l'estradiol ont une fréquence respiratoire significativement différente des animaux véhicules. Leur fréquence respiratoire brute à l'hypoxie est de 151 ± 8 c·min<sup>-1</sup>. De plus, le tableau 5 indique que la FR des animaux du traitement combiné tend à être inférieure à la FR des rats du groupe véhicule sans toutefois démontrer une différence significative (p=0.07).

**Figure 13: Résultats des rats âgés de 2 mois et ayant été traités durant 2 semaines postnatales aux hormones stéroïdiennes en situation hypoxique**



**Figure 13 :** Effet à long terme d'un supplément d'estradiol et de progestérone dans le lait maternel sur les réponses relatives (% vs normoxie, sauf pour le graphique A) A : différence entre la température interne en hypoxie et celle en normoxie en °C, B : la fréquence respiratoire en %, C : le volume courant en %, D : la ventilation en % et E : la production de CO<sub>2</sub> en %. Ces valeurs correspondent à une situation hypoxique pour des rats âgés de 2 mois. La situation hypoxique est de 30 mn. à O<sub>2</sub>=10%. Les valeurs moyennes sont présentées. Les barres d'erreurs indiquent le S.E.M.

\* indique les traitements qui diffèrent significativement du traitement véhicule (Pr<0.05).

**Volume courant des rats de 2 mois (fig.13C):**

Le pourcentage d'augmentation du volume courant des rats de 2 mois ne diffère pas significativement entre les groupes. Par contre, en tenant compte du poids et en analysant les données brutes avec le test du PLSD afin de détecter les différences entre les animaux traités et contrôles, les animaux estradiols démontrent un volume courant significativement supérieur aux animaux véhicules. Le groupe estradiol est celui qui démontre le volume courant le plus élevé ( $4.30 \pm 0.14$  ml BTPS/kg<sup>0.62</sup>). Le groupe véhicule avait un volume courant de  $3.77 \pm 0.08$  ml BTPS/kg<sup>0.62</sup>. L'estradiol est le principal facteur d'augmentation du volume courant.

**Ventilation des rats de 2 mois (fig.13D) :**

Aucune différence significative n'est notée entre les groupes d'animaux en observant le pourcentage d'augmentation de la ventilation par rapport à la situation en normoxie. En ce qui a trait à l'analyse des données brutes, la ventilation du groupe des animaux véhicules est  $93 \pm 5$  ml BTPS/min/100g et les autres groupes de traitement ne diffèrent pas significativement de cette valeur. Même en tenant compte des facteurs allométriques (tableau 5), nous ne trouvons aucune différence significative.

**Production de CO<sub>2</sub> des rats de 2 mois (fig.13E):**

Il n'y a aucune différence significative entre les groupes de traitement au niveau du pourcentage de variation de la production de CO<sub>2</sub> en hypoxie par rapport à la situation en normoxie. En analysant les données brutes avec le test de LSD utilisé à priori ; la production de CO<sub>2</sub> des rats traités aux hormones stéroïdiennes (E<sub>2</sub>, P et E<sub>2</sub>+P) est plus élevée en hypoxie. Ces animaux avaient aussi un métabolisme plus élevé en normoxie que les animaux véhicules. En situation hypoxique, ils réagissent en diminuant autant leur production de CO<sub>2</sub> que les animaux véhicules, ce qui fait que le métabolisme des animaux traités aux stéroïdes demeure significativement plus élevé que celui des véhicules lors de la période hypoxique. En tenant compte des facteurs allométriques (tableau 5), la différence

est observable seulement entre les groupes véhicules et progestérones en effectuant l'analyse des résultats avec un test LSD à priori.

### Points importants :

- 1) L'exposition à la progestérone en bas âge augmente le métabolisme à long terme et ce même en situation réduite d'oxygène.
- 2) Le traitement néonatal à l'estradiol permet une fréquence respiratoire inférieure et un volume courant supérieur à l'hypoxie.

**Tableau 5 :** Données brutes des résultats des adultes en hypoxie et résultats avec la correction pour les facteurs allométriques.

	Variables	Traitements			
		Véhicule	E <sub>2</sub>	PR	E <sub>2</sub> +PR
Données brutes	Temp. °C	36.4 ± 0.1	36.3 ± 0.1	36.4 ± 0.2	36.3 ± 0.1
	FR c·min <sup>-1</sup>	177 ± 6	151 ± 8*	161 ± 9	159 ± 6 <sup>p=0.07</sup>
	Vt/BW ml BTPS/100g	0.53 ± 0.01	0.67 ± 0.03*	0.57 ± 0.03	0.60 ± 0.01*
	Ve/BW ml BTPS/100g/mn	93.7 ± 4.8	99.9 ± 5.1	90.5 ± 3.5	95.5 ± 4.1
	VCO <sub>2</sub> /BW ml ATPS/100g/mn	1.46 ± 0.21	1.89 ± 0.12*	1.78 ± 0.05*	1.81 ± 0.05*
Données corrigées	Vt/BW ml BTPS/kg <sup>0.62</sup>	3.77 ± 0.08	4.30 ± 0.14*	4.05 ± 0.26	3.90 ± 0.09
	Ve/BW ml BTPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.62</sup>	668 ± 32	644 ± 35	642 ± 32	619 ± 25
	VCO <sub>2</sub> /BW ml ATPS·mn <sup>-1</sup> ·kg <sup>-0.68</sup>	13.1 ± 0.3	14.0 ± 0.4	14.5 ± 0.5*	13.7 ± 0.3

### Légende :

\* indique les résultats qui sont significativement différents (Pr<0.05) des résultats du groupe véhicule avec le test du LSD utilisé à priori. Les valeurs du LSD pour les résultats qui se rapprochent du seuil accepté sont écrites.

# CHAPITRE IV :

## **EXPRESSION OF SEX-STEROID RECEPTORS AND STEROIDOGENIC ENZYMES IN THE CAROTID BODY OF ADULT AND NEWBORN MALE RATS<sup>1</sup>.**

Vincent Joseph, Van Diep Doan, Catherine-Eve Morency, Yves Lajeunesse, Aida Bairam.  
Brain Research 1073-1074 (2006) 71-82.

Department of Pediatrics, Laval University, Centre de Recherche (D0-711), Hôpital St-François d'Assise, 10 rue de l'Espinay, Quebec (QC), G1L 3L5, Canada.

Running title: steroid receptors and steroidogenic enzymes in carotid body

Contact information :

V. Joseph

Centre de recherche CHUQ, Hôpital St François d'Assise

Courriel: joseph.vincent@crsfa.ulaval.ca

---

<sup>1</sup> Reproduit de Brain Research, volumes 1073-1074, Joseph V, Doan VD, Morency CE, Lajeunesse Y, Bairam A., *Expression of sex-steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn male rats*. Pages 71-82, Epub (2006), avec la permission de Elsevier.  
Je remercie tous les auteurs de cet article ainsi que Elsevier.

## Résumé de l'article

### EXPRESSION DES RÉCEPTEURS SEXUELS STÉROÏDIENS ET DES ENZYMES STÉROÏDOGÉNIQUES DANS LE CORPS CAROTIDIENS DES RATS ADULTES ET NOUVEAUX-NÉS

Cette étude décrit la localisation et le patron d'expression des récepteurs à l'estradiol et à la progestérone de même que les enzymes clés de la synthèse des stéroïdes (P450 side-chain-cleavage--P450scc, et P450 aromatasase—P450Aro) dans le corps carotidien (CB) et le ganglion cervical supérieur (SCG) des rats mâles adultes, nouveaux-nés et en fin de gestation en utilisant l'immunohistochimie, Western Blot et le RT-PCR en temps réel. Nos résultats démontrent que le récepteur à l'estradiol  $Er\beta$  et les isoformes 80 KDa et 60 KDa du récepteur à la progestérone (PR-A et PR-C) sont exprimés dans le CB, alors que dans le SCG,  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$ , les récepteurs à la progestérone 80 KDa et 60 Kda sont exprimés. Il y avait un fort marquage de P450scc dans le CB et dans le SCG, alors que celui de P450Aro était négatif. Chez les animaux en fin de gestation et les nouveaux-nés,  $Er\alpha$  n'a pas été détecté dans le CB ni dans le SCG, mais un léger marquage de P450Aro est apparu au niveau du corps carotidien, et en moindre extension dans le SCG. P450scc a été fortement exprimé dans le CB et le SCG des nouveaux-nés et des animaux en fin de développement fœtal. Nous concluons que le corps carotidien démontre une expression constitutive de  $Er\beta$  et PR et pourrait être capable de synthétiser des stéroïdes, incluant l'estradiol, à la fin de la vie fœtale.

Note : Toutes les références citées dans cette article se retrouvent à la fin de ce mémoire.

## **Avant-propos**

L'étudiante a participé à l'expérimentation en intervenant au niveau de l'analyse immunohistochimique des coupes du corps carotidien et du ganglion cervical supérieur pour la détection des récepteurs à la progestérone et à l'estradiol des rats nouveaux-nés. Cette étude a été importante pour la suite de la recherche effectuée dans le cadre de la maîtrise de l'étudiante en question. Cette expérience a permis de répondre à un des objectifs fixés ; déterminer s'il existe des récepteurs à la progestérone et à l'estradiol au niveau du corps carotidien des rats. La détection de ces récepteurs, nous a permis de proposer l'hypothèse de recherche à la base du mémoire de l'étudiante étant que l'E<sub>2</sub> et la PR pourraient participer conjointement au développement des chémorécepteurs périphériques dès la naissance et influencer les paramètres ventilatoires et métaboliques des rats. Le papier a été rédigé par Vincent Joseph qui est l'auteur principal, l'étudiante est coauteure de l'article. Les autres coauteurs qui ont participé aux expérimentations et à la rédaction du papier sont Aida Bairam, Van Diep Doan et Yves Lajeunesse travaillant tous au département de Pédiatrie du Centre de Recherche de l'Hôpital St-François d'Assise. L'article est publié dans la revue Brain Research.

## Abstract

This study describes the localization and pattern of expression of estradiol and progesterone receptors as well as key enzymes for steroid synthesis (i.e. P450 side-chain-cleavage - P450scc, and P450 aromatase - P450Aro) in the carotid body (CB) and superior cervical ganglion (SCG) of adult, newborn and late fetal male rats, using immunohistochemistry, western blot and real-time-RT-PCR. Our results show a constitutive expression of the beta estradiol receptor (Er $\beta$ ) and the 80 Kda and 60 Kda progesterone receptors (PR-A & PR-C) isoforms in the CB, while in the SCG Er $\alpha$ , Er $\beta$ , PR-A and PR-C are expressed. While P450aro staining was negative, P450scc staining was strong both in the SCG and CB. In late fetal and newborn rats, Er $\alpha$  was not detected in the CB or SCG, but a slight staining appeared for P450 aromatase in the CB, and to a lesser extent in SCG. P450scc was strongly expressed in CB and SCG of late fetal and newborn rats. We conclude that the carotid body shows a constitutive expression of Er $\beta$  and PR and may be able to synthesize steroids, including estradiol during late fetal life.

184 words

**Theme E:** Endocrine and autonomic regulation – respiratory regulation.

**Keywords:** Carotid body, estradiol receptors, progesterone receptors, steroidogenic enzymes, adult rats, newborn rats.

## Abbreviations:

CB: Carotid body

Er $\beta$ : Estradiol receptor beta

Er $\alpha$ : Estradiol receptor alpha

P450scc: cytochrome P450 side-chain-cleavage

P450Aro: cytochrome P450 aromatase

PRA, PRB & PRC: Progesterone receptor A, B & C

SCG: Superior Cervical Ganglion

TH: tyrosine hydroxylase

## Introduction

The peripheral chemoreceptors localized in the carotid bifurcation are the main oxygen sensors participating in respiratory and sympathetic regulation [60]. Their function is critical in various processes, including the maintenance of a stable respiratory rhythm (i.e. avoiding the generation of apneas) [7, 8, 61], and supporting adequate respiratory plasticity during chronic hypoxic exposure [62, 63]. Ovarian steroids, including estradiol and progesterone have been recognized as major modulators of carotid body activity, exerting an overall stimulatory effect on baseline activity and hypoxic chemo-responsiveness of the peripheral chemoreceptors [64-67]. This effect has significant implications for general respiratory homeostasis, including ventilatory adjustment during gestation [68, 69] or chronic hypoxic exposure [70, 71], and is a protective factor against the occurrence of sleep apneas in adult women [72-74].

We recently provided evidence supporting the hypothesis of a role for placental-derived steroids, such as estradiol and progesterone, in the control of adequate carotid body development [68, 75]. Indeed, it is largely recognized that steroids act as multipotent developmental factors that exerts specific effects on a variety of target tissue, including the reproductive tract [76] and central or peripheral nervous system [77-81]. In the developing central or peripheral nervous system, estradiol can be provided either through maternal transfer of placental steroids, or as the result of local synthesis in neurons and/or glial cells that express the molecular machinery required for steroid synthesis [82, 83].

Despite the fact that ovarian steroids modulate the activity of the peripheral chemoreceptors there are no detailed description of the type and localization of steroid receptors in the carotid body. We thus performed a series of studies using immunohistochemistry, western blot and real-time RT-PCR analysis in adult, late fetal (gestational day 21, i.e. 1 day before delivery), and newborn (postnatal days 0 and 2) male rats. We assessed the expression of the main estrogen (i.e.  $Er\alpha$  and  $Er\beta$ ) and progesterone (i.e. PR-A, PR-B and PR-C) receptors, and the enzymes involved in the first step of steroid synthesis (cytochrome P450 side-chain-cleavage- P450<sub>scc</sub>) and estradiol synthesis (cytochrome P450 Aromatase – P450<sub>Aro</sub>) in the carotid bodies and in the nearby superior cervical ganglion (SCG), a

sympathetic relay harboring sympathetic noradrenergic cell bodies. Our results demonstrate a constitutive expression of  $Er\beta$ , PR-A, PR-C and P450scc in the carotid body and superior cervical ganglion of adult male rats, clear immunostaining for  $Er\beta$ , PR and P450scc in newborn and shows that the P450aro enzyme is expressed in the carotid body of late fetal rats, thus supporting the hypothesis of a wider role than previously recognized for steroids, including local steroids synthesis, in carotid body of both newborn and adult rats.

## Results

### **Ovarian steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body and superior cervical ganglion in adult rats.**

Figure 1 shows immunohistochemical staining for  $Er\beta$ ,  $Er\alpha$  and PR in the carotid body and superior cervical ganglion (SCG) of adult male rats at low (200 x) and high (600 x) magnification. The visual examination clearly shows that both PR and  $Er\beta$  are present in SCG and in the carotid body, while  $Er\alpha$  is present in the SCG, but not in the carotid body (the staining was never clearly distinct from background obtained after omission of the primary antibody). High-resolution pictures show that  $Er\beta$  immunoreactivity is localized in islets of densely packed cells with round nuclei (i.e. type I cells) but not in surrounding tissues and the staining was apparently absent from type II cells (flattened cells with long nuclei located at the periphery of type I cell islets – see Fig. 1). PR was also mainly concentrated in type I cell islets. In the SCG,  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$  and PR immunoreactivity was localized in large neurons and double fluorescent labeling confirmed that  $Er\beta$  is localized in TH immunoreactive cells in the carotid body and in the SCG (Fig 2A), while  $Er\alpha$  is also localized in TH<sup>+</sup> cells in the SCG, but not in the carotid body (Fig. 2B).

P450 aromatase staining was not detected in the carotid body or superior cervical ganglion in adult male rats, but a strong staining appeared for the P450 side-chain-cleavage enzyme (Figure 3).

While the antibodies used for estrogen receptors were specifically directed against each isoform (i.e.  $Er\alpha$  or  $Er\beta$ ), the antibody for progesterone receptor recognizes the three main isoforms of the receptor (PR-A, PR-B and PR-C). To differentiate between these isoforms, we performed western blot analysis of PR in protein extracted from a pool of CB and SCG of adult male rats, and from the uterus of an adult female as a positive control tissue. The western blot showed that the 80 Kda and 60 Kda PR (PR-A and PR-C) are present, while the heavier PR (PR-B) isoform is not detectable in CB and SCG (Figure 4A). After analysis of the optical density of the bands and normalization to the optical density obtained for actin, the relative expression of PR was about 1.2 times higher in CB than in SCG (PR-A) and 2.8 for PR-C, while the expression of PR-A was 10 times higher in the CB than in the uterus (4 times higher for PR-C – Figure 4B).

To further characterize the expression of ovarian steroid receptors at the mRNA level, we performed real time RT-PCR on mRNA extracted from a pool of carotid body and SCG of adult male rats, with primers specifically designed to amplify  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$ , PR and tyrosine hydroxylase as a positive control for each tissue. The results show a clear expression of  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$ , PR and TH mRNAs both in the carotid body and SCG confirmed by gel analysis of the real-time RT-PCR products (Figure 5). In the carotid body  $Er\beta$  was below the detection threshold for the gel analysis, but was clearly detected by the SYBR green staining during real-time RT-PCR (inserts in Figure 5B).

### **Ovarian steroid receptors and steroidogenic enzymes in the carotid body and superior cervical ganglion in newborn and late fetal rats.**

Immunohistochemical analysis of the carotid artery bifurcation was performed in male rat pups at the age of 21 gestational day, on the day of birth (P0) and 2 days following birth for  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$  and PR to assess the potential developmental regulation of hormone receptors and the potential expression of steroidogenic enzymes (P450scc and P450Aro).

As observed in adults, Er $\beta$  was detected in the carotid body and SCG of late fetal and newborn rats, while Er $\alpha$  was apparently not expressed in the SCG and carotid bodies, which contrasts with the strong expression of Er $\alpha$  reported in the adult SCG. On the other hand, a weak signal for P450 aromatase was detected in the carotid body and SCG of G21 rats, but not in older animals (Figure 6), while a strong signal for the P450scc enzyme was observed in the carotid body and superior cervical ganglion, but also in surrounding tissues (Figure 7).

## Discussion

This study demonstrates a constitutive expression for the beta estradiol and progesterone receptors in the carotid body of both newborn and adult male rats. The morphological feature of the stained cells strongly suggest that Er $\beta$  and PR are localized in clusters of chemosensitive cells of the carotid body, and that Er $\alpha$ , Er $\beta$  and PR are localized in noradrenergic neurons of the superior cervical ganglion. Double labeling confirmed co-localization of Er $\beta$  and Er $\alpha$  with TH in the CB and/or SCG. Western blot analysis shows that the shortest progesterone receptor isoforms (PR-A & PR-C) are present in the carotid body and SCG, while real-time RT-PCR confirmed the presence of mRNA for PR, Er $\beta$  and Er $\alpha$  in the SCG but also in the carotid body, which contrast with the pattern of protein expression.

The superior cervical ganglion, showed age-independent constitutive expression for Er $\beta$  and PR, while the expression of SCG Er $\alpha$  was only apparent in adults. P450 aromatase, the enzyme involved in estradiol synthesis, has been detected in the carotid body and superior cervical ganglion of late fetal rats, but is not detectable in older animals. On the other hand P450scc shows a very strong staining in the carotid body and superior cervical ganglion, both in newborn and adult rats. Overall, these results strongly suggest that steroids, including locally synthesized steroids, may play a critical role on carotid body function through nuclear receptor signaling both during development and in adults.

## General comments on sex steroid receptors

This study was designed to report the expression of "classical", or "genomic" estrogen and progesterone receptors, which are members of the steroid receptor super-family, known to modulate the expression of specific genes upon ligand binding. Two forms of estradiol receptors have been described: the  $\alpha$  estradiol receptor [Era - 84] and the  $\beta$  estradiol receptor [Er $\beta$  - 85]. While Era and Er $\beta$  are both specifically activated by estradiol binding, they are distinctly distributed in the central nervous system [86, 87] where Er $\beta$  is thought to play a pivotal by regulating cell migration, apoptotic neural death [88] and astroglial cells proliferation [89]. The transcriptional activity of Era and Er $\beta$  are clearly distinct as recently demonstrated by microarray assays in human cells engineered to express either Era or Er $\beta$  [90]. On the other hand, membrane-bound receptors mediate some estrogenic effects, the molecular identity of these receptors remains unclear but may include Er $\alpha$ , Er $\beta$  and specific G proteins localized on cell surface or on the endoplasmic reticulum [91, 92], but our study was not designed to detect membrane bound estradiol receptors.

Similarly, at least 3 forms of the progesterone receptors (PR-A, PR-B and PR-C) that are generated by the transcription of a single gene have been described [93-96]. In vitro, PR-B has been reported to function as a ligand-dependent transactivator of progesterone-responsive genes in contrast to PR-A, which in some contexts, acts as a ligand-dependent transcriptional repressor of PR-B and other steroid hormone receptors, including estradiol receptor [97, 98]. In-vivo, PR-A and PR-B are generally co-expressed and the variations of their expression ratio are thought to play a role in physiological and pathophysiological processes [see 93, 99]. Nonetheless, PR-A also has a specific function that extends beyond its role of repressor of PR-B since PR-A and PR-B modulate the expression of different genes [100]. PR-C has been identified as a 60Kda N-terminally truncated isoform of the progesterone receptor that lack one of the zinc finger involved in DNA binding, but is nonetheless able to form heterodimer with PR-A and PR-B and enhances their transcriptional activities, thus contributing to the complex and tissue-specific action of progesterone [95, 96]. Additionally, progesterone receptors can regulate the activity of other steroid receptors such as the glucocorticoid, androgen and estradiol receptors,

modulate neural function through non-genomic receptors and be activated through phosphorylation in the absence of classic hormonal ligand (i.e. progesterone), thus adding a supplemental complexity to the role played by progesterone receptors signaling [see 93, 94].

### **Estrogen and progesterone receptors in the carotid body of adult male rats.**

Our results provide clear clues that the effects evoked by steroid hormones on carotid body function [65, 67] are at least partially related to the expression of the classical genomic receptors, including  $Er\beta$ , PR-A and PR-C. Interestingly, it has been recently reported that estradiol reduces the expression of tyrosine hydroxylase through  $Er\beta$  activation, while  $Er\alpha$  activation stimulates tyrosine hydroxylase expression [101]. These findings are consistent with our current description of  $Er\beta$  expression in the carotid body and our previous demonstration that endogenous ovarian steroids inhibit tyrosine hydroxylase activity in the carotid body of adult female rats [65]. Our current data thus opens the way to a better understanding of the effects of steroid hormones on carotid body functions through the utilization of specific modulators of steroid receptor subtypes or transgenic animals.

While protein synthesis is mainly controlled by mRNA synthesis (i.e. transcription), the translation of mRNA to protein may also be tightly regulated by a series of mechanisms relatively well described [102], accordingly, it is not completely unexpected to find the discrepancy between protein and mRNA expression for  $Er\alpha$ . In a parallel series of experiments, we exposed adult rats to 3 days of hypoxic exposure, a situation known to induce cell proliferation in the CB. Since  $Er\alpha$  is known as a proliferative factor, we also evaluated the expression of  $Er\alpha$  protein in the carotid body. While we observed a strong increase of proliferative cells in the carotid body (i.e. # of cells stained for the Proliferating Cell Nuclear Antigen – PCNA), there was no apparent  $Er\alpha$  staining, as in control rats (unpublished). Hence, we do not understand why  $Er\alpha$  mRNA would be expressed without protein translation in the CB, but this is apparently not related to hypoxic-induced proliferation.

While it was not our principal objective, we also report specific pattern of expression of the steroid receptors in the superior cervical ganglion (SCG). The SCG is a sympathetic relay that receives cholinergic nerve terminals and sends noradrenergic fibers innervating numerous targets of the sympathetic nervous system. It is thus relevant to mention that ovarian steroids are recognized to influence cardio-circulatory regulations through an effect on the sympathetic nervous system [103, 104], including a depression of the response evoked by cholinergic stimulation in the superior cervical ganglion [105]. Thus the description of a constitutive expression of  $Er\beta$ , PR-A and PR-C and developmentally regulated expression of  $Er\alpha$  in the superior cervical ganglion of rats may be useful to further understand the effects of ovarian steroids on the sympathetic nervous system both in adult and newborn mammals. Additionally, our data support the hypothesis of a direct effect of estradiol and progesterone on carotid body function and/or development during early life, thus providing a receptor-based model to further explore the hormonal dependent modulation of carotid body function in newborn rats [68, 75].

### **Expression of steroidogenic enzymes in the carotid body of adult and newborn rats.**

It is well documented that non-gonadal tissues, such as neurons and glial cells are able to synthesize steroids and express the necessary enzyme for steroid synthesis [82, 83], a process of particular importance in neural tissues [82, 106]. In the human fetuses, P450scc (the enzyme catalyzing the first step of steroid synthesis, i.e. the conversion of cholesterol to pregnenolone) mRNA is widely expressed in recognized steroidogenic tissues (i.e. adrenals, testis, ovaries), but also in a variety of other tissues, including the aorta, brain, heart, kidneys, lungs, pancreas and stomach but the specific role played by this widespread expression is not clearly understood [83]. Accordingly, we have found a strong staining of P450scc in the carotid body and superior cervical ganglion, but also in surrounding tissues, including aorta, in both newborn and adults. Since local steroid synthesis appears as a very potent source of autocrine/paracrine regulation of a variety of cellular function, our data provide clear evidences that local steroid synthesis may play a yet unrecognized role in carotid body function during development and in adults.

In the central nervous system, the expression of cytochrome P450 aromatase, the enzyme that allows estradiol synthesis from its precursors (i.e. testosterone and androstendione) is developmentally regulated, with a peak expression occurring in discrete brain areas during late fetal and/or early postnatal life [107, 108]. During this developmental window, estradiol is thought to play a critical developmental role mainly by establishing cellular fate (i.e. the choice between apoptosis or survival), an effect related to the regulation of specific neural growth factors including a positive regulatory role on the expression of neurotrophins and their receptors [79, 109] and on the glial cell line-derived neurotrophic factor [77]. These trophic factors are involved in the development of neural network, including branching of sensitive synaptic terminals within peripheral chemoreceptors [110, 111]. To date, there is no data supporting a function of estradiol on the expression of neurotrophic factors in the carotid body during development, but this remains an interesting hypothesis supported by our actual data.

## **Conclusion**

The detailed significance of the specific pattern of expression for progesterone and estradiol receptors as well as P450scc and P450Aro expression in the carotid body of fetal or newborn rats may be put in perspective by considering recent results in the field. In this context, our current data and actual experimental model [68] are critical to further explore the role played by steroids during respiratory control development, a particularly important topic regarding the particular respiratory physiology of premature newborn, which are critically dependent on carotid body function to maintain adequate respiratory drive [5] and are chronically deprived from circulating steroids normally furnished by the placenta [42]. It is also particularly relevant to underlie the fact that maternal treatment with progesterone to avoid recurrent preterm delivery reduced the need for supplemental oxygen in the newborn, an effect that could be, at least partially, related to an effect on respiratory neural control [112]. Accordingly, future studies should aim at further elucidating the role of steroids, including but not limited to, estradiol and progesterone for adequate carotid body functions both in newborn and adults.

## **Experimental procedure**

### **Tissue preparation for immunohistochemistry**

All experimental procedures have been approved by the local ethic committee (Université Laval) on animal use and care. Two weeks following arrival in the laboratory, adult Sprague-Dawley male rats (n=10, 2-4 months old, ordered from Charles River, St Constant, Canada) were deeply anesthetized (ketamine/xylazine), the chest was rapidly opened and the animals were perfused with 500 ml ice-cold PBS solution through the heart. Following perfusion, the neck was opened and the carotid bifurcation was exposed, cleaned from surrounding tissues, and dissected en-bloc with the superior cervical ganglion and carotid body. The dissected bifurcation was post-fixed in 4% PFA for 24 hours at 4°C, cryoprotected in 30% sucrose at 4°C for 24 hours, embedded in tissue-tek and frozen on dry ice. Tissues slices (10 µm thickness) were cut on a cryostat, mounted on glass slides and kept frozen (-80°C).

Newborn male rats (P0, i.e. 6-12 hours following birth, P2, i.e. 48-60 hours following birth, n=4 for each age, born from a total of 2 litters) were anesthetized in melting ice, the heart was rapidly removed to avoid bleeding during dissection, the neck was opened and the carotid bifurcation removed en-bloc. For late fetal rats, time pregnant rats (n=2) were obtained in our animal facility on the basis of daily vaginal smears to determine estrous cycle and optimal mating day. On the 21<sup>st</sup> gestational day (i.e. 1 day before delivery), the pregnant dam was deeply anesthetized (as described for adults) and the fetuses removed from the uterine horns for dissection of the carotid bifurcation as described above. Tissues were then fixed, embedded, cut and mounted on glass slides as described for adult rats.

### **Immunohistochemistry**

We used antibodies that have been firmly recognized for binding specificity (see table 1 and included references) and preliminary studies showed staining at adequate molecular weight in western blots on protein extracted from from control tissues (not shown).

### **With DAB revelation**

Tissues slices were dried 2 hours (37 °C) and washed 3 x 5 min in PBS. Antigen retrieval was performed by placing the slides in a microwave oven at maximum power (700 w) and boiled for 20 minutes in sodium citrate (10 mM, pH 6.0). Slides have been allowed to cool to room temperature for 30 minutes within the citrate solution and washed 3 x 5 minutes in PBS before blockade of endogenous peroxidase activity with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%) and washed 3 x 5 minutes in PBS. Non-specific binding sites have been blocked for 30-60 minutes with blocking serum (goat serum 2 %, Triton 0.2% in PBS) before incubation with the selected primary antibody (see table 1) for 16 hours at 4°C.

Slides are then washed 3 x 5 min in PBS before incubation with secondary biotinylated antibody (see table 1). Slides are then washed 3 x 5 min in PBS, incubated in the vectastain elite avidin-biotinylated enzyme complex method and the antigen-antibody complex is visualized with diaminobenzidine peroxidase (DAB - Vector Laboratories). Following DAB reaction, counterstaining was performed with hematoxyline for 30-60 seconds. Negative control slides were treated under strictly similar conditions without primary antibodies. All slices have been observed under a Nikon Eclipse E600 microscope. For each antibody tested, at least 2 animals (from different litters for newborn) have been tested.

### **Double Immunofluorescence staining**

Tissues slices have been treated as described above with Er $\beta$  or Er $\alpha$  primary and secondary antibodies, washed 3 x 5 min in PBS then incubated with fluorescent avidin-D (2  $\mu$ g/mL – 30 minutes at room temperature, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for FITC (i.e. green) fluorescence. Slides were washed in PBS (3 x 5 min), incubated with blocking serum 15 minutes, washed (2 x 5 min) and incubated with the avidin/biotine blocking kit (Vector Laboratories) for 15 min and washed 2 x 5 minutes, then incubated with normal blocking serum 30-60 minutes at room temperature. Slides were then incubated with tyrosine hydroxylase antibody 90 min at 37°C (mouse TH monoclonal antibody, 1/500 – Chemicon, Temacula, CA, USA), washed 3 x 5 min in PBS before incubation with

secondary biotinylated antibody (horse anti-mouse, 1/200 – 1 hour). Slides were washed 3 x 5 min in PBS then incubated with Texas Red Avidin D for 30 minutes at room temperature (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  - Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for Texas Red fluorescence. Slides were washed 3 x 5min in PBS, covered with Vectashield mounting media (Vector Laboratories) and observed under a fluorescent microscope (Nikon Eclipse E600). Negative control slides were treated under strictly similar conditions without primary antibodies. TH staining appeared with a red fluorescence (excitation wavelength : 540-580 nm, filtered emission : 600-660 nm), and Er $\beta$  or Er $\alpha$  with a green fluorescence (excitation wavelength : 465-495 nm, filtered emission: 515-555 nm). All the images presented have been processed using the following procedure: for each fluorochrome the acquisition software determined the adequate exposure time and the selected images were stored on a computer. Negative control slides were then recorded under strictly similar conditions for FITC and TxRed fluorescence. The images were analyzed with Adobe Photoshop using a standard procedure for background subtraction: the histogram in the adequate color channel was read from the negative control, and adjusted until elimination of background and auto-fluorescence signals. The same correction was then applied to the corresponding positive image to obtain the final corrected image.

### **Tissue dissection for western-blot and real-time RT-PCR**

The animal preparation, surgery, and organ collection were similar to that described previously [113]. Briefly, each animal (n=17, 5-6 months old) was anesthetized with an i.p. injection of ketamine (10 mg/100g) and xylazine (1.5 mg/100g). Then the rat was rapidly tracheotomized and artificially ventilated. The carotid body and superior cervical ganglion were cleaned from the surrounding tissues, quickly removed, frozen immediately on dry ice and stored at -80°C. Two pools containing respectively 12 and 5 pairs of carotid body and superior cervical ganglion were constituted for western blot and real-time RT-PCR analysis respectively.

## Western-blot

Carotid bodies (n = 24, weight = 2,2 mg) and SCG (n = 24, weight = 25 mg) pools were placed in 300  $\mu$ l (carotid body) or 500  $\mu$ l (superior cervical ganglion) RIPA extraction buffer (20 mM tris, 300 mM NaCl, 0.5 % SDS, 0.5% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, pH 7.2) containing complete protease inhibitor following the description of manufacturer (Roche diagnostic, Laval, QC, Canada) and 1  $\mu$ g/ml pepstatin A, 0,1 mg/ml benzamidine HCL, and 1mM sodium ortho-vanadate (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Then, the homogenization was made with a Polytron homogenizer for 30-90 sec at 4°C (pta-7, Brinkmann, Mississauga, ON, Canada).

The homogenized materials were kept on ice for 30 min before centrifugation at 13,000 g for 30 minutes. The supernatant fluid was collected and total protein concentrations were determined by spectrophotometry using a BCA<sup>TM</sup> protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA). For carotid bodies, the protein assay was below detection threshold. The protein extract (200  $\mu$ l) was thus concentrated to 35  $\mu$ l using a microcon YM-10 (millipore corporation, Bedford, MA, USA) filter and prepared for loading in 2 immunoblotting wells (1 positive and 1 negative, see below). For superior cervical ganglion and uterus, 75  $\mu$ g of proteins were used. Proteins were mixed with loading buffer (75 mM Tris-HCL, pH 6.8, 10 % glycerol, 720 mM beta-mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% bromophenol blue) and denatured for 5 min at 95°C, electrophoresed by SDS-PAGE on 7,5% gel and electro-transferred overnight onto nitrocellulose membranes (GE Osmonics, Minnetonka, Minnesota, USA). Membranes were then rinsed in PBS with 0.1% Tween-20 (PBS-T), blocked for 1 hour in 5% fat-free milk, secondary antibody (1/10000) and 0,1% sodium azide in PBS-T at room temperature, washed three times in blocking solution without secondary antibody. Membranes were cut around the 48 Kda weight maker. They were then incubated in blocking solution without secondary antibody for 3 hours at room temperature with progesterone receptor antibody (upper part of the membrane - see table 1) or with mouse anti actin monoclonal primary antibody (lower part of the membrane, 1/200, clone JLA20, DSHB, Univ. of Iowa, IA, USA). After three washes in PBS-T, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature in horseradish peroxidase-conjugated

secondary antibody of either 1/20000 goat anti-rabbit (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) or 1/10000 goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) in PBS-T. After washing with PBS-T three times, specific bands were visualized by chemiluminescence reagents (Amersham Pharmacia Biotech, Montreal, QC, Canada).

Membranes were exposed to X-ray film (FUJI) for 45 minutes (progesterone) or 30 minutes (actin) and the intensity of the signal was quantified by densitometry using the NIH ImageJ software. The specificity of antibody was tested in samples run and incubated without primary antibody.

### **Real time RT-PCR**

Total RNA extraction as well as the RT phase (with 1  $\mu$ g RNA for superior cervical ganglion and 100 ng for carotid body) using random decamer primers for transcripts amplifications were performed as previously described [113, 114]. Aliquots of 2  $\mu$ l from the resulting single-stranded cDNA products were used along with the appropriate primers (see table 2) for Er $\alpha$ , Er $\beta$ , PR and 1  $\mu$ l was used for tyrosine hydroxylase (TH) mRNA amplification. Each amplifications was run in separate wells with 2 X SYBR Green Universal PCR Master Mix containing 400 nM of each of specific forward and reverse gene primers (total 25  $\mu$ l). Primers used have been designed to overlap over the boundaries of two exons to avoid amplification of genomic DNA, using the Primer Express software program (Applied Biosystems, version 2.0, Foster city, CA). PCR amplification was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster city, CA) according to manufacture's instruction. Amplification conditions were the same for all assays: one cycle at 95°C for 10 min, 40 cycles at 95°C for 15 sec and a final step at 60°C for 60 sec. Control samples amplified without RT were run and did not yield any amplification signal. PCR products were loaded on a 2 % agarose gel stained with ethidium bromide (2  $\mu$ l/100 ml) for migration during 3 hours at 200 V and visualized under UV trans-illumination.

**Acknowledgements:**

The authors are thankful to Evelyne Vachon and Sylvie Viger for animal care. Jorge Soliz for careful reading of the manuscript and helpful comments. Catherine-Eve Morency received a fellowship from Centre de Recherche de l'Hôpital St François d'Assise.

Grants: supported by Fond de la Recherche en Santé du Québec, The Hospital for Sick Children Foundation (Grant #XG 04-032), Canadian Institute for Health Research, and Fondation de la Recherche des Maladies Infantiles.

## Table Legends:

**Table 1**

**Antibodies**

Antigen	primary antibody	secondary antibody
Er $\alpha$ – prokaryotic recombinant protein, full length Er $\alpha$ [115].	Mouse monoclonal 1/100 (clone 6F11) – NovoCastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK.	Horse anti-mouse (1/200 – 1 hour) – Vector laboratories.
Er $\beta$ - 18 amino acid synthetic peptides derived from the C-terminus of mouse Er $\beta$ [116, 117].	Rabbit polyclonal (clone Z8P) 1 $\mu$ g/mL – (Zymed Laboratories, South San Fransisco, CA, USA).	Goat anti-rabbit (1/200 – 1 hour) - Vector laboratories.
PR – synthetic peptide against an internal domain of the human progesterone receptor.	Polyclonal (clone sc539) 1/200 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA.	Goat anti-rabbit (1/200 – 1 hour) - Vector laboratories.
P450 Aro – synthetic peptide, amino acids 376-390 of human aromatase [118].	Mouse monoclonal (clone H4) 1/20 – Serotec, Raleigh, NC, USA.	Horse anti-mouse (1/200 – 1 hour) – Vector laboratories.
P450 scc – amino acids 421-441 of rat P450scc protein [119].	Rabbit polyclonal 1/200 – US Biological (Swampscott, MA, USA).	Goat anti-rabbit (1/200 – 1 hour) - Vector laboratories.

**Table 1:** List of antibodies (and their respective antigens) used to perform immunohistochemistry of Er $\alpha$ , Er $\beta$ , PR, P450Aro and P450scc analysis.

**Table 2**  
**Primers sequence**

Gene		sequence	expected product size	Accession N°
Er $\alpha$	Sense	5' GGTGGACCCATTGCCTTTC 3'	101 bp	NM_001008511
	Antisense	5' GATGAGACACCAGGGCGTTAA 3'		
Er $\beta$	Sense	5' GTCTCCTTTAGCGACCCATTG 3'	159 bp	NM_012754.1
	Antisense	5' CATGTAACAGGGCTGGCACAAC 3'		
PR	Sense	5' CGACACTTCCAGCTCTTTGCT 3'	131 bp	NM_022847.1
	Antisense	5' GAATCAGGGTTATCTGGTCATCG 3'		
TH	Sense	5' CTCAGAGCAGGATGCCAAGC 3'	63 bp	NM_012740.2
	Antisense	5' TGTCGCCGTC CGATGAA 3'		

**Table 2:** sequence of primers pairs used to perform real-time RT-PCR analysis of Er $\alpha$ , Er $\beta$ , PR, and TH.

## Figure Legends:

*Figure 1:*

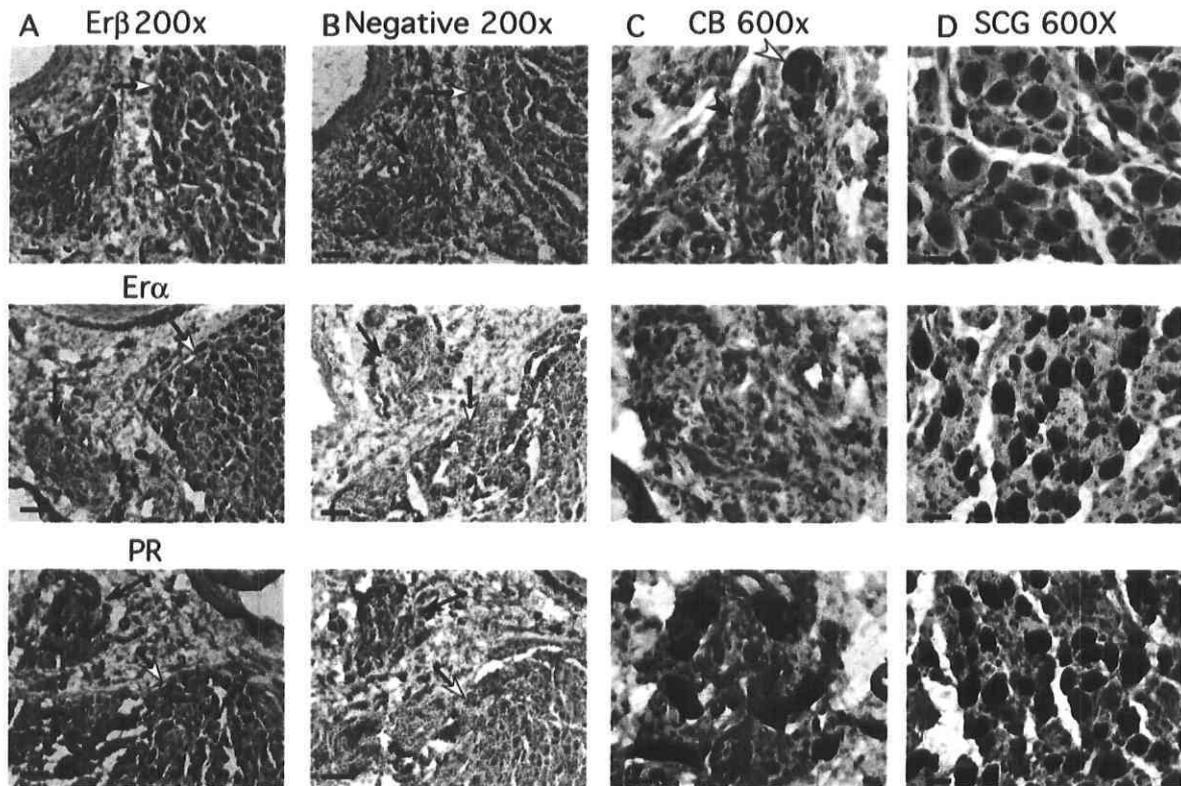
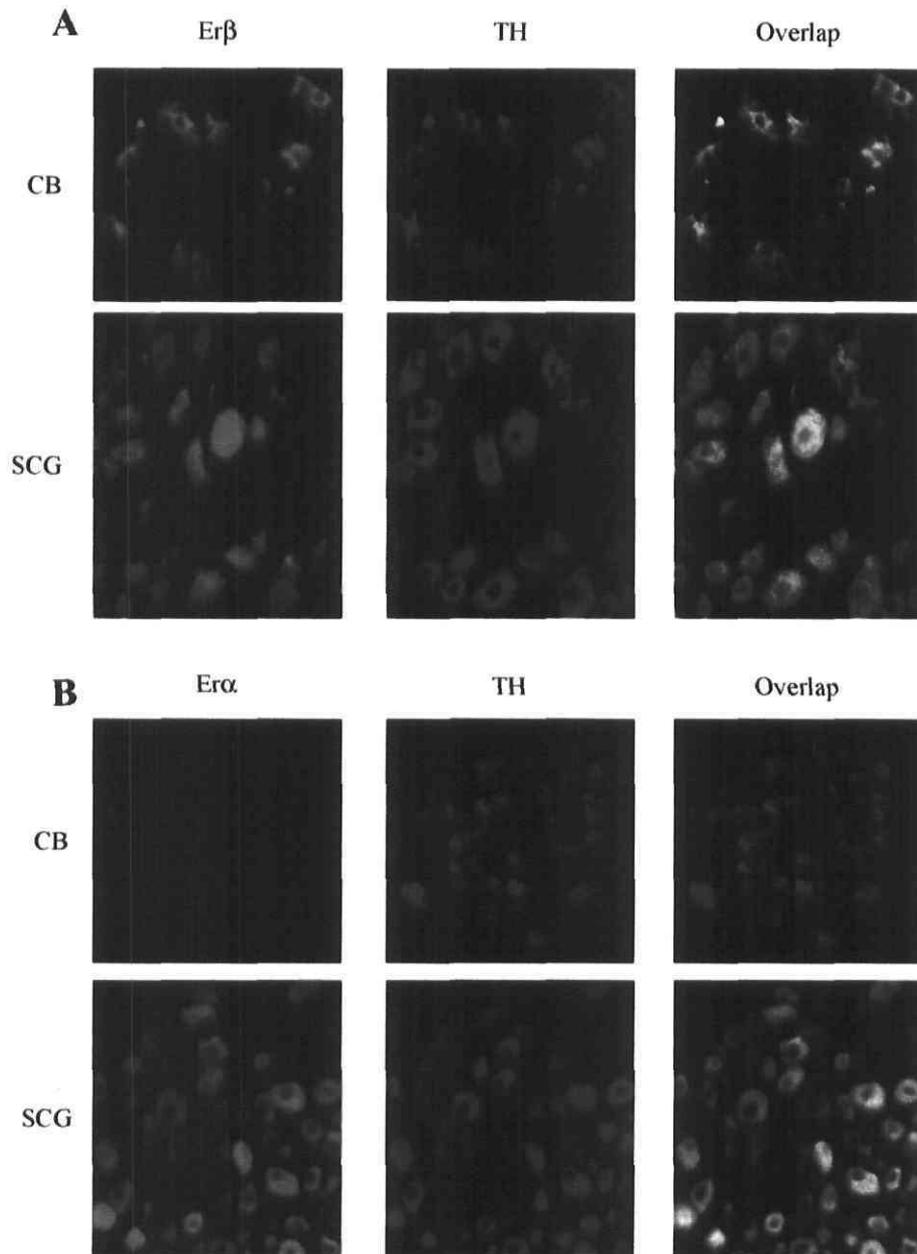


Figure 1

**Figure 1:** Typical immunostaining obtained for estradiol receptor  $\beta$  (Er $\beta$  - higher row),  $\alpha$  (Er $\alpha$  - middle row) and progesterone receptor (PR - lower row) on carotid bifurcation of adult male rats. Columns from left to right: A) low magnification images showing both CB (black arrow) and SCG (white arrow - 200 x - scalebars = 100  $\mu$ m), B) Negative staining on control slides at 200 x magnification, C) high magnification images showing carotid bodies; and D) SCG (600 x - scalebars = 20  $\mu$ m). On column C, for Er $\beta$ , the white arrowhead points to an islet of type-I cells, the black arrowhead points to a type II cells (see text).

**Figure 2:****Figure 2**

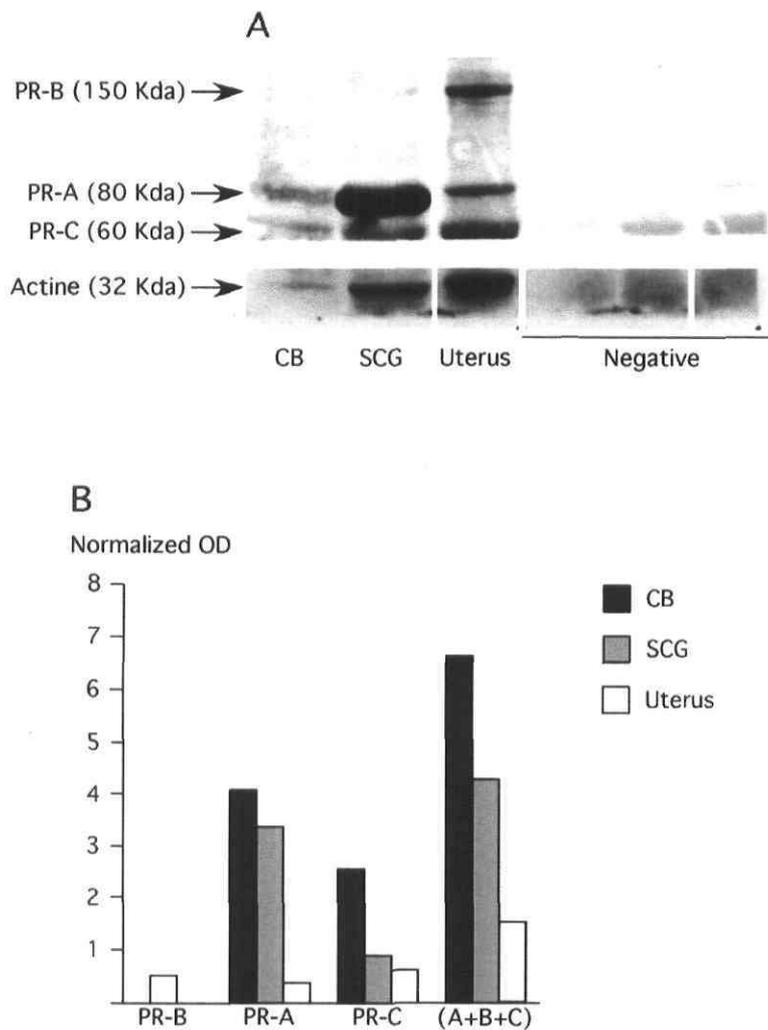
**Figure 2:** A) Double fluorescent immunostaining showing co-localization of Erβ and tyrosine hydroxylase (TH) in the carotid body and SCG, B) Double fluorescent immunostaining showing colocalization of Erα and tyrosine hydroxylase (TH) in the SCG only.

**Figure 3:**

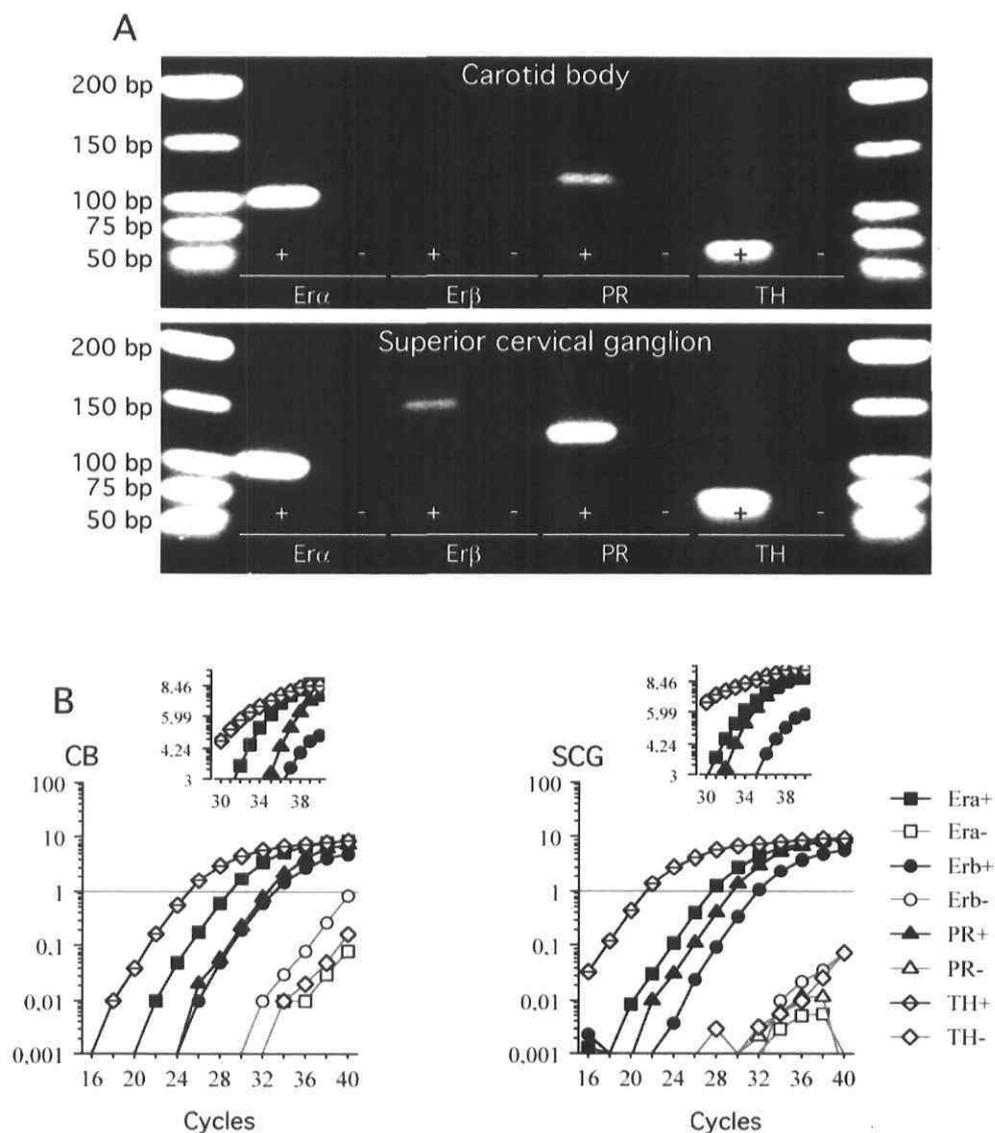


Figure 3

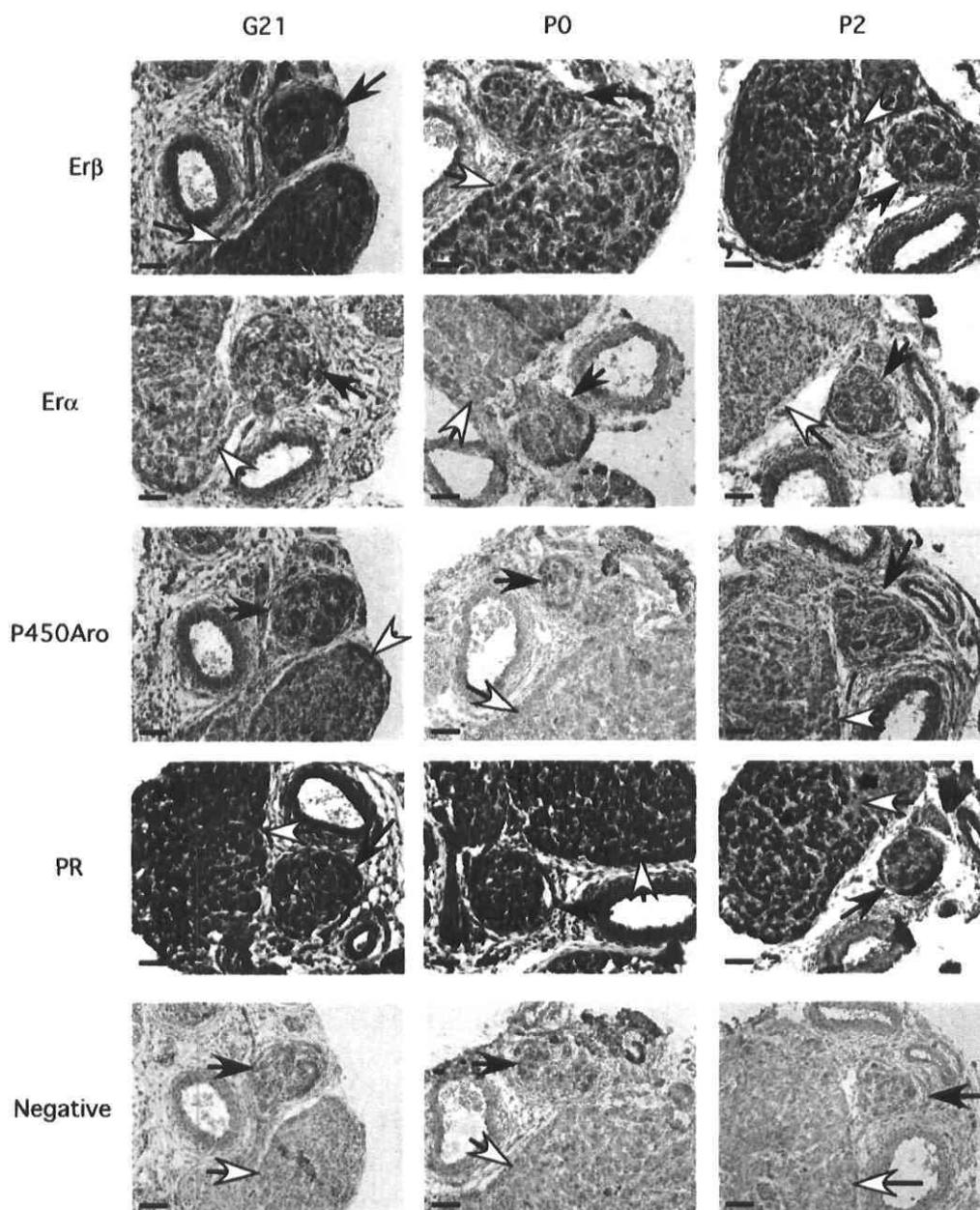
**Figure 3:** Typical immunostaining obtained for P450<sub>scc</sub> and P450<sub>Aro</sub> in the carotid body (black arrow) and superior cervical ganglion (white arrow) of adult male rats. P450<sub>scc</sub> immunostaining is strongly positive in the SCG and carotid body, while P450<sub>aro</sub> staining is negative in both tissues. Scalebars = 100  $\mu$ m (200 x magnification).

**Figure 4:****Figure 4**

**Figure 4:** A) Western blot analysis of proteins extracted from carotid bodies (CB) and superior cervical ganglia (SCG) pooled from adult male rats and uterus from an adult female rat. In the CB and SCG, only the shortest PR isoforms appear (PR-A and PR-C). B) graphical representation of relative expression level (optical density for PR corrected to actin, arbitrary units) for PR in the CB, SCG and uterus.

**Figure 5:****Figure 5**

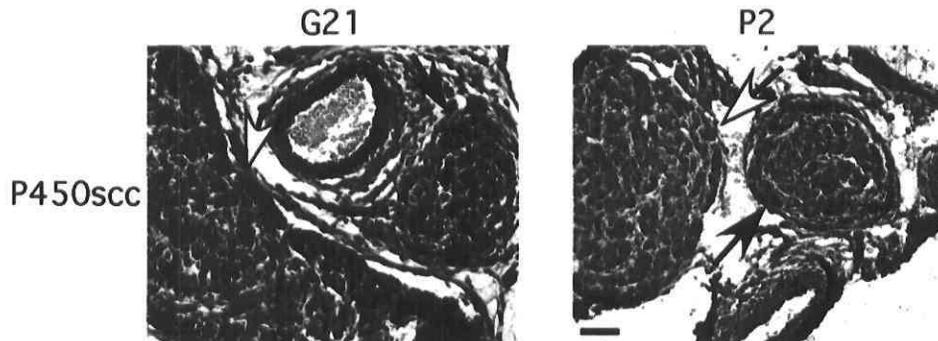
**Figure 5:** Gel analysis (A) and SYBR green detection (B) of real-time RT-PCR products of mRNA extracted from carotid bodies (CB) and superior cervical ganglia (SCG) pooled from adult male rats for  $Er\alpha$ ,  $Er\beta$ , PR and tyrosine hydroxylase (TH). The inserts in the lower panels show the details for the last 10 cycles of amplification that explains the absence of  $Er\beta$  on the gel analysis for the carotid bodies.

**Figure 6:****Figure 6**

**Figure 6:** Typical immunostaining obtained for estradiol receptor  $\alpha$  ( $Er\alpha$ ),  $\beta$  ( $Er\beta$ ), progesterone receptor and cytochrome P450 aromatase (P450Aro) in the carotid body (black arrow) and superior cervical ganglion (white arrow) of late gestational (G21) and

newborn rats (0 and 2 days old). Scalebars = 100  $\mu\text{m}$  (200 x magnification).

**Figure 7:**



**Figure 7**

**Figure 7:** Typical immunostaining obtained for P450scc and P450Aro in the carotid body (black arrow) and superior cervical ganglion (white arrow) of late gestational (G21) and 2 days-old male rats. P450scc immunostaining is strongly positive in the SCG and carotid body and in surrounding tissues.

Scalebars = 100  $\mu\text{m}$  (200 x magnification).

**CHAPITRE V :**

**DISCUSSION**

**&**

**CONCLUSION**

## 5.1 Rappel

L'objectif principal de cette étude était de décrire les effets d'une exposition combinée d'estradiol et de progestérone sur le développement du système de contrôle respiratoire des rats nouveau-nés et d'établir les effets chroniques potentiels. Nous avons choisi un modèle permettant de prolonger l'exposition de l'estradiol et de la progestérone en implantant une micropompe délivrant ces stéroïdes à la mère qui les transfère ensuite par le lait maternel aux rejetons. Afin d'établir les effets à long terme nous avons choisi d'effectuer les mesures sur les ratons à l'âge de dix jours et puis à l'âge de deux mois. Les rats étaient exposés aux suppléments de stéroïdes dès le premier jour de leur naissance et ce durant 14 jours. Cette approche assurait une exposition hormonale adéquate en permettant d'éviter tout stress causé par la manipulation des ratons. Effectivement, il a déjà été prouvé que le stress pouvait interférer avec le développement postnatal du contrôle respiratoire [50]. Afin d'effectuer les mesures respiratoires et métaboliques en minimisant le stress, nous avons utilisé la méthode de la pléthysmographie. Cette technique est la plus courante pour l'étude de la respiration, car elle constitue une technique non invasive permettant de mesurer la ventilation au cours de longues périodes de temps.

Initialement, l'hypothèse de recherche proposait que l'exposition postnatale à l'estradiol et la progestérone engendraient des effets synergiques au niveau du système de contrôle respiratoire. Nous verrons maintenant que ce n'est pas aussi simple, car selon les paramètres d'intérêts ces hormones peuvent avoir des effets synergiques ou non.

## 5.2 Ce que démontrent les résultats

### 5.2.1 Le corps carotidien démontre une expression des récepteurs à l'estradiol et à la progestérone.

Au chapitre IV, l'expression du récepteur  $\beta$  à l'estradiol (Er  $\beta$ ) et l'expression des récepteurs à la progestérone PR-A et PR-C ont été démontré au niveau du corps carotidien

chez les ratons P-10 et chez les rats adultes. Ce qui soutient l'hypothèse d'un effet direct de l'estradiol et de la progestérone sur le contrôle respiratoire tout au long développement.

### **5.2.2 Le traitement d'estradiol combiné à la progestérone influence fortement le poids des ratons à l'âge de 10 jours et celui des rats de 2 mois.**

Nos résultats démontrent clairement que l'exposition à l'estradiol postnatale diminue le poids des ratons âgés de dix jours et ce davantage en présence de progestérone. Pour ce qui est du traitement combiné d'estradiol et de progestérone, la diminution du poids peut aller jusqu'à 21 % par rapport aux animaux véhicules. Cette différence de poids est aussi observée à l'âge de 2 mois. Il reste maintenant à savoir si cela est dû à un retard de croissance ou à une diminution de la masse de tissu adipeux ou musculaire ou autre. Lors d'une prochaine expérience, nous pourrions mesurer la grandeur des rats en plus de leur masse et calculer leur indice de masse corporelle (IMC), ce qui nous permettrait de faire une distinction entre grandeur et grosseur.

### **5.2.3 L'estradiol est un facteur de réduction du métabolisme, de la FR et de la thermorégulation de base chez les ratons de 10 jours.**

L'estradiol influence la température basale des ratons en diminuant celle-ci de 1°C. L'addition de progestérone au traitement n'altère ni n'augmente l'effet de l'estradiol sur la température corporelle en situation normale. L'estradiol diminue aussi la fréquence respiratoire et la production de CO<sub>2</sub> de base des animaux nouveaux-nés. De plus, la progestérone seule n'affecte pas la fréquence respiratoire ni le métabolisme des animaux et son addition au traitement d'estradiol ne cause pas de changement notable sur les effets engendrés par E<sub>2</sub>. L'estradiol est donc le principal acteur dans la réduction du métabolisme et de la fréquence respiratoire en situation de normoxie.

#### **5.2.4 Chez les rats en situation hypoxique, la progestérone influence la ventilation et l'estradiol abolie la réponse thermique.**

La progestérone joue un plus grand rôle à l'hypoxie. Effectivement, la progestérone est l'acteur le plus important pour l'augmentation de la ventilation et du volume courant chez les rats en situation réduite d'O<sub>2</sub>. De plus, sa combinaison avec l'estradiol amplifie la réponse de la progestérone seule en ce qui a trait au volume courant (tableau 3). Par contre, l'estradiol abolie la réponse thermique des rats à l'hypoxie en maintenant leur température corporelle, chez les rats E<sub>2</sub> la réponse métabolique est légèrement inférieure à celle observée chez les contrôles (figures 10 A et E).

#### **5.2.5 Effets des hormones stéroïdiennes sur les paramètres ventilatoires en situation normale et en situation hypoxique des animaux de deux mois.**

En normoxie, les animaux adultes qui avaient été traités avec l'estradiol durant deux semaines postnatales démontrent une fréquence respiratoire inférieure et un volume courant supérieur comparativement aux animaux véhicules. En tenant compte du poids des animaux, ceux qui ont été traité avec une combinaison d'estradiol et de progestérone sont les seuls à démontrer une ventilation inférieure aux animaux contrôles. En ce qui a trait à la situation hypoxique, les animaux traités à l'estradiol ont une FR inférieure et un Vt supérieur en hypoxie comparativement aux animaux véhicules.

#### **5.2.6 Effets des hormones stéroïdiennes sur le métabolisme des animaux âgés de deux mois en situation normale et en situation hypoxique.**

En tenant compte de la différence de poids entre les groupes, l'exposition aux hormones stéroïdiennes lors du développement postnatal augmente le métabolisme des animaux ayant reçu le traitement de progestérone. Ce métabolisme supérieur est observé seulement chez ce groupe tant en normoxie qu'en situation réduite d'oxygène.

## 5.3 Considérations méthodologiques

### 5.3.1 Technique de l'implantation des micropompes osmotiques

L'implantation de la micropompe osmotique chez la mère permettait de faire passer les hormones stéroïdiennes par le lait maternel aux bébés sans imposer de manipulations stressantes à ces derniers. Toutefois, Delbecchi et al. ont étudié l'effet de l'estradiol chez les vaches et démontrent qu'une injection d'estradiol affecte la production laitière des vaches en diminuant celle-ci. De plus, l'estradiol modifierait la concentration du lait en réduisant de 37,6% la concentration en gras et de 15,9% le contenu en lactose [120]. Dans le même ordre d'idées, une autre étude visant à déterminer les effets de l'estradiol et de la progestérone sur la fréquence d'éjection du lait, a démontré le pouvoir des hormones ovariennes à altérer les caractéristiques du réflexe d'éjection du lait des rats. Effectivement, les traitements à l'estradiol et à la progestérone diminuaient la fréquence d'éjection du lait maternel [121]. En ajoutant ces perspectives à la présente étude, il est possible que la diminution de la production et de la qualité laitière des mères traitées à l'estradiol ait eu un effet sur la croissance des ratons, en imposant un retard de croissance aux ratons. Par contre, toutes les données à ce sujet ne font pas encore front commun, d'autres recherches indiquent que l'estradiol n'affecterait pas la production laitière des vaches [122].

Dans l'idée de tenir compte d'un impact possible sur la quantité et la qualité du lait maternel des mères recevant un traitement d'estradiol et de la progestérone, les prochaines études feront en sorte d'exposer directement les bébés à la progestérone ou à l'estradiol sous forme de comprimé sous-cutané. Les animaux auront par contre à subir un stress chirurgical, mais la qualité et la quantité de lait maternel disponible sera semblable pour tous les animaux. Nous pourrions donc vérifier si la cause de la différence de poids des ratons est reliée à l'impact des hormones stéroïdiennes sur le lait maternel.

Ces nouvelles considérations méthodologiques ne viennent en aucun cas invalider les résultats obtenus concernant le contrôle respiratoire et la régulation de la température corporelle des animaux. À ce sujet, il a été démontré que la quantité de lait maternel

disponible affectait la grosseur des ratons sans modifier le contrôle thermal et respiratoire. Dans l'étude en question, la quantité de lait maternel était la conséquence du nombre de bébés par portée (6 ou 16 ratons). Les animaux les plus petits (provenant des familles de 16 ratons) avaient un métabolisme inférieur durant les 2-3 premières semaines de vie et par la suite supérieur par rapport aux ratons plus gros provenant de portées réduites à six ratons. Malgré l'observation d'une différence du niveau métabolique et du nombre de calories ingérées qui était fonction de la quantité de lait maternel disponible, les auteurs montraient que ces différences n'affectent ni le développement du contrôle respiratoire ni la thermorégulation [123]. Or nos résultats ont tenu compte des différences de poids pour le calcul du volume courant, de la ventilation et du métabolisme, et ils démontrent clairement l'impact des hormones stéroïdiennes sur ces paramètres.

### **5.3.2 Importance de la plasticité respiratoire dans l'élaboration du protocole**

Un des objectifs de l'étude était de déterminer si l'exposition à l'estradiol et/ou la progestérone postnatale engendrait des changements de la fonction chémoréflexe à long terme. Pour ce faire, lors de l'élaboration du protocole nous avons dû tenir compte de la notion de plasticité (voir introduction).

Premièrement, nous avons choisi de séparer les ratons d'une même portée en deux groupes; une première moitié étant testée à l'âge de dix jours et l'autre seulement à deux mois. Cela nous permettait d'avoir pour chaque groupe d'âge des rats qui provenaient de plusieurs familles différentes et qui n'avaient subi aucune hypoxie néonatale. Selon la littérature, l'hypoxie néonatale engendre une plasticité du développement en causant des changements persistants du contrôle de la respiration [124] [125]. Ce qui venait interférer avec l'effet spécifique recherché; soit celui de l'estradiol et/ou de la progestérone.

Deuxièmement, la plasticité respiratoire peut être influencée par une multitude de facteurs dont le génotype, l'âge, le genre et les gaz respiratoires, et il est important que les études en plasticité respiratoire tiennent compte de tous ces facteurs dans l'élaboration du protocole [15]. Afin de prendre en compte ces informations et de limiter l'ampleur de l'étude nous

avons choisi de tester seulement les rats mâles. Il serait toutefois intéressant, lors d'une prochaine étude de tester des rats femelles et de pouvoir comparer les résultats, car il est possible que les hormones stéroïdiennes affectent davantage les femelles ou de manière différente.

En somme, afin de trouver un traitement pour les prématurés souffrant de troubles respiratoires qui est adéquat et sans risque pour leur qualité de vie future, il est important de saisir l'effet des hormones stéroïdiennes sur la plasticité respiratoire. En effet, la plasticité respiratoire peut être bénéfique en adaptant le contrôle moteur respiratoire à des perturbations fréquentes ou de longues durées et pourrait conduire à des traitements futurs intéressants [126].

### **5.3.3 Risques des thérapies utilisant des hormones sexuelles stéroïdiennes**

Notre étude chez les rats propose plusieurs rôles bénéfiques de l'estradiol et de la progestérone pour le développement adéquat du contrôle respiratoire des nouveaux-nés. Toutefois, il est nécessaire de connaître tous les effets de ces hormones stéroïdiennes à court et à long terme avant de pouvoir utiliser nos connaissances en situation clinique, d'où l'importance de cette recherche. Effectivement, par le passé il a été démontré que l'utilisation durant la grossesse du diethylstilbestrol (DES), une hormone stéroïdienne, pouvait avoir des conséquences néfastes sur le développement des enfants. Dans les années 60, le DES servait de traitement chez les femmes ayant une grossesse à haut risque. Cependant, des études épidémiologiques ont démontré que les filles des mères traitées au DES durant leur grossesse couraient un risque significativement plus élevé de développer un adénocarcinome vaginal [127]. De plus, les fils de ces mères traités au DES démontraient des anomalies urogénitales [128].

## **5.4 Perspectives**

L'estradiol et la progestérone pourraient seuls ou en combinaison constituer un traitement réduisant la morbidité et/ou la mortalité des enfants prématurés. Le modèle expérimental

utilisé au cours de cette étude consistait en une hypoxie isolée de 30 minutes à 10% d'oxygène. Toutefois en situations cliniques, les conditions infantiles causant l'hypoxie intermittente, tel que l'obstruction des voies aériennes supérieures, sont plus communes que celles conduisant à une hypoxie ou une hypercapnie isolée. [129-131]. Il serait donc intéressant lors d'une prochaine expérience de vérifier l'efficacité du modèle expérimental en soumettant les animaux à une hypercapnie-hypoxie intermittente, phénomène qui est plus commun qu'une hypoxie isolée. Nous pourrions ainsi vérifier si nous obtenons des résultats comparables à court et à long terme.

Une des perspectives intéressantes de cette étude, consiste en l'interprétation des résultats pour les animaux adultes traités à la progestérone, lesquels ont démontré un métabolisme plus élevé que les animaux contrôles. Tel qu'il en a été question dans l'introduction, la réponse métabolique à l'hypoxie des prématurés souffrant d'instabilités respiratoires fournit les bases pathophysiologiques du syndrome métabolique [4]. Le traitement postnatal pourrait donc potentiellement être un traitement efficace non seulement dans l'immédiat, mais aussi à long terme en protégeant les prématurés de développer l'obésité de par leur métabolisme plus élevé. L'obésité se développe lorsqu'il y a déséquilibre entre l'énergie ingérée et l'énergie dépensée, ce qui varie énormément entre chaque individu et entre chaque jour pour une même personne. Des hauts niveaux d'énergie ingérée et/ou des faibles dépenses énergétiques contribuent à l'obésité. La dépense énergétique par la pratique d'activité physique est encouragée pour la santé et pour la perte de poids, mais la plupart des individus font très peu d'exercice [132]. Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle le traitement postnatal des apnées par traitement combiné d'estradiol et de progestérone permet aussi de contrôler le poids des individus et par conséquent de réduire le risque de souffrir du syndrome métabolique en augmentant le métabolisme des individus, il serait possible d'expérimenter l'effet de plusieurs diètes à différentes teneurs en calories sur la composition corporelle et la tension artérielle des rats adultes ayant été traités ou pas aux hormones stéroïdiennes en période postnatale.

## 5.5 Conclusion

Il ne fait aucun doute que la respiration est une fonction vitale et que cette fonction poursuit sa maturation durant les premières semaines et mois de vie. Chez les prématurés, l'immaturité du développement du système de contrôle respiratoire constitue un déterminant majeur des désordres de patrons respiratoires. Actuellement en néonatalogie, fournir des soins adéquats aux prématurés et aux prématurés extrêmes représente un important défi. Il faut trouver des moyens efficaces de traiter le développement des maladies pulmonaires qui causent des handicaps irréversibles chez les prématurés en particulier. Cette étude a permis une meilleure compréhension des effets de la progestérone, de l'estradiol et de leur combinaison sur le système de contrôle respiratoire chez le rat en développement. Nos résultats mettent en lumière le potentiel thérapeutique de l'estradiol et de la progestérone comme stratégie d'intervention chez les prématurés. Par exemple, l'estradiol pourrait être utilisée pour réduire le métabolisme des prématurés et permettre de contrôler les dommages potentiels d'apnées fréquentes. Toutefois, avant que les praticiens puissent appliquer ces nouveaux concepts et améliorer la qualité et les bénéfices des soins fournis à leurs patients, il convient de mieux connaître les dangers à long terme liés à l'utilisation des hormones stéroïdiennes. Nous devons également améliorer notre compréhension de la régulation complexe du système de contrôle respiratoire relié à l'utilisation des hormones stéroïdiennes et ce tout au long de la maturation.

# RÉFÉRENCES

1. Soliz, J. and V. Joseph, *Perinatal steroid exposure and respiratory control during early postnatal life*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2005. **149**(1-3): p. 111-22.
2. Miller, M.J. and R.J. Martin, *Apnea of prematurity*. *Clin Perinatol*, 1992. **19**(4): p. 789-808.
3. Darnall, R.A., et al., *Margin of safety for discharge after apnea in preterm infants*. *Pediatrics*, 1997. **100**(5): p. 795-801.
4. Waters, K. and D. Gozal, *Developmental and metabolic implications of the hypoxic ventilatory response*. *Paediatr Respir Rev*, 2004. **5**(3): p. 173-81.
5. Al-Matary, A., et al., *Increased peripheral chemoreceptor activity may be critical in destabilizing breathing in neonates*. *Semin Perinatol*, 2004. **28**(4): p. 264-72.
6. Nock, M.L., et al., *Relationship of the ventilatory response to hypoxia with neonatal apnea in preterm infants*. *J Pediatr*, 2004. **144**(3): p. 291-5.
7. Nakayama, H., et al., *Carotid body denervation eliminates apnea in response to transient hypocapnia*. *J Appl Physiol*, 2003. **94**(1): p. 155-64.
8. Smith, C.A., H. Nakayama, and J.A. Dempsey, *The essential role of carotid body chemoreceptors in sleep apnea*. *Can J Physiol Pharmacol*, 2003. **81**(8): p. 774-9.
9. Hunt, R., P.G. Davis, and T. Inder, *Replacement of estrogens and progestins to prevent morbidity and mortality in preterm infants*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2004(4): p. CD003848.
10. Jones, J.F., *Retrospective view of the carotid body research of Ronan G. O'Regan*. *Exp Physiol*, 2004. **89**(1): p. 39-43.
11. Finley, J.C. and D.M. Katz, *The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat*. *Brain Res*, 1992. **572**(1-2): p. 108-16.
12. Bairam, A. and J.L. Carroll, *Neurotransmitters in carotid body development*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2005. **149**(1-3): p. 217-32.
13. Gonzalez, C., et al., *Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges*. *Physiol Rev*, 1994. **74**(4): p. 829-98.
14. Donnelly, D.F., *Development of carotid body/petrosal ganglion response to hypoxia*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2005. **149**(1-3): p. 191-9.
15. Mitchell, G.S. and S.M. Johnson, *Neuroplasticity in respiratory motor control*. *J Appl Physiol*, 2003. **94**(1): p. 358-74.
16. Abu-Shaweesh, J.M., et al., *Changes in respiratory timing induced by hypercapnia in maturing rats*. *J Appl Physiol*, 1999. **87**(2): p. 484-90.
17. Williams, B.A., et al., *Development of respiratory chemoreflexes in response to alternations of fractional inspired oxygen in the newborn infant*. *J Physiol*, 1991. **442**: p. 81-90.
18. Katz-Salamon, M., *Delayed chemoreceptor responses in infants with apnoea*. *Arch Dis Child*, 2004. **89**(3): p. 261-6.
19. Bureau, M.A., et al., *Postnatal maturation of respiration in intact and carotid body-chemodenervated lambs*. *J Appl Physiol*, 1985. **59**(3): p. 869-74.
20. Carroll, J.L., O.S. Bamford, and R.S. Fitzgerald, *Postnatal maturation of carotid chemoreceptor responses to O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in the cat*. *J Appl Physiol*, 1993. **75**(6): p. 2383-91.
21. Rigatto, H., J.P. Brady, and R. de la Torre Verduzco, *Chemoreceptor reflexes in preterm infants: I. The effect of gestational and postnatal age on the ventilatory response to inhalation of 100% and 15% oxygen*. *Pediatrics*, 1975. **55**(5): p. 604-13.

22. Blanco, C.E., et al., *The response to hypoxia of arterial chemoreceptors in fetal sheep and new-born lambs*. J Physiol, 1984. **351**: p. 25-37.
23. Blanco, C.E., et al., *Breathing pattern of kittens during hypoxia*. J Appl Physiol, 1984. **56**(1): p. 12-7.
24. Bisgard, G.E., *Increase in carotid body sensitivity during sustained hypoxia*. Biol Signals, 1995. **4**(5): p. 292-7.
25. Jansen, A.H., et al., *Effect of carotid chemoreceptor denervation on breathing in utero and after birth*. J Appl Physiol, 1981. **51**(3): p. 630-3.
26. Hofer, M.A., *Lethal respiratory disturbance in neonatal rats after arterial chemoreceptor denervation*. Life Sci, 1984. **34**(5): p. 489-96.
27. Donnelly, D.F. and G.G. Haddad, *Prolonged apnea and impaired survival in piglets after sinus and aortic nerve section*. J Appl Physiol, 1990. **68**(3): p. 1048-52.
28. Forster, H.V., et al., *Important role of carotid chemoreceptor afferents in control of breathing of adult and neonatal mammals*. Respir Physiol, 2000. **119**(2-3): p. 199-208.
29. Cote, A., H. Porras, and B. Meehan, *Age-dependent vulnerability to carotid chemodenervation in piglets*. J Appl Physiol, 1996. **80**(1): p. 323-31.
30. Taylor, H.G., N. Klein, and M. Hack, *School-age consequences of birth weight less than 750 g: a review and update*. Dev Neuropsychol, 2000. **17**(3): p. 289-321.
31. Hack, M. and A.A. Fanaroff, *Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990s*. Semin Neonatol, 2000. **5**(2): p. 89-106.
32. Eichenwald, E.C., A. Aina, and A.R. Stark, *Apnea frequently persists beyond term gestation in infants delivered at 24 to 28 weeks*. Pediatrics, 1997. **100**(3 Pt 1): p. 354-9.
33. Henderson-Smart, D.J., *The effect of gestational age on the incidence and duration of recurrent apnoea in newborn babies*. Aust Paediatr J, 1981. **17**(4): p. 273-6.
34. Henderson-Smart, D.J., M.C. Butcher-Puech, and D.A. Edwards, *Incidence and mechanism of bradycardia during apnoea in preterm infants*. Arch Dis Child, 1986. **61**(3): p. 227-32.
35. Decker, M.J. and D.B. Rye, *Neonatal intermittent hypoxia impairs dopamine signaling and executive functioning*. Sleep Breath, 2002. **6**(4): p. 205-10.
36. Gozal, E. and D. Gozal, *Respiratory plasticity following intermittent hypoxia: developmental interactions*. J Appl Physiol, 2001. **90**(5): p. 1995-9.
37. Gauda, E.B., et al., *Maturation of peripheral arterial chemoreceptors in relation to neonatal apnoea*. Semin Neonatol, 2004. **9**(3): p. 181-94.
38. Kenny, F.M., et al., *Unconjugated estrogens in the perinatal period*. Pediatr Res, 1973. **7**(10): p. 826-31.
39. Datta, S., et al., *Plasma and cerebrospinal fluid progesterone concentrations in pregnant and nonpregnant women*. Anesth Analg, 1986. **65**(9): p. 950-4.
40. Hercz, P., *Quantitative changes in steroid and peptide hormones in the maternal-fetoplacental system between the 28th-40th weeks of pregnancy*. Acta Med Hung, 1985. **42**(1-2): p. 29-39.
41. Tulchinsky, D. and C.J. Hobel, *Plasma human chorionic gonadotropin, estrone, estradiol, estriol, progesterone, and 17 alpha-hydroxyprogesterone in human pregnancy. 3. Early normal pregnancy*. Am J Obstet Gynecol, 1973. **117**(7): p. 884-93.

42. Trotter, A., et al., *17Beta-estradiol and progesterone supplementation in extremely low-birth-weight infants*. *Pediatr Res*, 1999. **45**(4 Pt 1): p. 489-93.
43. Regensteiner, J.G., et al., *Combined effects of female hormones and metabolic rate on ventilatory drives in women*. *J Appl Physiol*, 1989. **66**(2): p. 808-13.
44. Doan, V.D., S. Gagnon, and V. Joseph, *Prenatal blockade of estradiol synthesis impairs respiratory and metabolic responses to hypoxia in newborn and adult rats*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004. **287**(3): p. R612-8.
45. Chu, A.J. and S.A. Rooney, *Estrogen stimulation of surfactant synthesis*. *Pediatr Pulmonol*, 1985. **1**(3 Suppl): p. S110-4.
46. Khosla, S.S., et al., *Effects of estrogen on fetal rabbit lung maturation: morphological and biochemical studies*. *Pediatr Res*, 1981. **15**(9): p. 1274-81.
47. Trotter, A., L. Maier, and F. Pohlandt, *Calcium and phosphorus balance of extremely preterm infants with estradiol and progesterone replacement*. *Am J Perinatol*, 2002. **19**(1): p. 23-9.
48. Baulieu, E.E., et al., *Progesterone as a neurosteroid: actions within the nervous system*. *Cell Mol Neurobiol*, 1996. **16**(2): p. 143-54.
49. Behan, M., et al., *Sex steroid hormones and the neural control of breathing*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003. **136**(2-3): p. 249-63.
50. Genest, S.E., et al., *Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat*. *J Physiol*, 2004. **554**(Pt 2): p. 543-57.
51. Mitchell, G.S., et al., *Invited review: Intermittent hypoxia and respiratory plasticity*. *J Appl Physiol*, 2001. **90**(6): p. 2466-75.
52. Waters, K.A. and D. Gozal, *Responses to hypoxia during early development*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003. **136**(2-3): p. 115-29.
53. Lipton, A.J., et al., *S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia*. *Nature*, 2001. **413**(6852): p. 171-4.
54. Baker, T.L., et al., *Respiratory plasticity: differential actions of continuous and episodic hypoxia and hypercapnia*. *Respir Physiol*, 2001. **129**(1-2): p. 25-35.
55. Bartlett, D., Jr. and S.M. Tenney, *Control of breathing in experimental anemia*. *Respir Physiol*, 1970. **10**(3): p. 384-95.
56. Kim, S.W., et al., *Modulation of rat vaginal blood flow and estrogen receptor by estradiol*. *J Urol*, 2004. **172**(4 Pt 1): p. 1538-43.
57. LaPolt, P.S., J.R. Day, and J.K. Lu, *Effects of estradiol and progesterone on early embryonic development in aging rats*. *Biol Reprod*, 1990. **43**(5): p. 843-50.
58. Montano, M.M., W.V. Welshons, and F.S. vom Saal, *Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats*. *Biol Reprod*, 1995. **53**(5): p. 1198-207.
59. Mortola, J.P., et al., *Metabolism and ventilation in hypoxic rats: effect of body mass*. *Respir Physiol*, 1994. **97**(2): p. 225-34.
60. Gonzalez, C., et al., *Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges*. *Physiol Rev*, 1994. **74**: p. 829-898.
61. Chenuel, B.J., et al., *Increased propensity for apnea via dopamine-induced carotid body inhibition in sleeping dogs*. *J Appl Physiol*, 2005. **98**(5): p. 1732-9.
62. Smith, C., et al., *Carotid bodies are required for ventilatory acclimatization to chronic hypoxia*. *J Appl Physiol*, 1986. **60**: p. 1003-1010.
63. Joseph, V. and J.M. Pequignot, *Neurochemical processes involved in acclimatization to long term hypoxia*, in *Oxygen sensing: Responses and adaptation*

- to hypoxia, S. Lahiri, G.L. Semenza, and N.R. Prabhakar, Editors. 2003, Marcel Dekker INC: New York. p. 467-488.
64. Hannhart, B., C.K. Pickett, and L.G. Moore, *Effects of estrogen and progesterone on carotid body neural output responsiveness to hypoxia*. J Appl Physiol, 1990. **68**(5): p. 1909-16.
  65. Joseph, V., et al., *Dopaminergic metabolism in carotid bodies and high altitude acclimatization in female rats*. Am J Physiol, Regulatory Integrative and Comparative Physiology, 2002. **282**: p. R765-R773.
  66. Tatsumi, K., et al., *Influences of gender and sex hormones on hypoxic ventilatory response in cats*. J Appl Physiol, 1991. **71**(5): p. 1746-51.
  67. Tatsumi, K., et al., *Role of endogenous female hormones in hypoxic chemosensitivity*. J Appl Physiol, 1997. **83**(5): p. 1706-1710.
  68. Doan, V.D., S. Gagnon, and V. Joseph, *Prenatal blockade of estradiol synthesis impairs respiratory and metabolic responses to hypoxia in newborn and adult rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004. **287**(3): p. R612-R618.
  69. Moore, L.G., R.E. McCullough, and J.V. Weil, *Increased HVR in pregnancy: relationship to hormonal and metabolic changes*. J Appl Physiol, 1987. **62**(1): p. 158-63.
  70. León-Velarde, F., et al., *The role of menopause in the development of chronic mountain sickness*. Am J Physiol, 1997. **272**(R41): p. R90-R94.
  71. León-Velarde, F., et al., *Relationship of ovarian hormones to hypoxemia in women residents of 4,300 m*. Am J Physiol, 2001. **280**: p. R488-R493.
  72. Shahar, E., et al., *Hormone replacement therapy and sleep-disordered breathing*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(9): p. 1186-92.
  73. Saaresranta, T., et al., *Effect of medroxyprogesterone on inspiratory flow shapes during sleep in postmenopausal women*. Respir Physiol Neurobiol, 2003. **134**(2): p. 131-43.
  74. Young, T., et al., *Menopausal status and sleep-disordered breathing in the Wisconsin Sleep Cohort Study*. Am J Respir Crit Care Med, 2003. **167**(9): p. 1181-5.
  75. Soliz, J. and V. Joseph, *Perinatal steroid exposure and respiratory control during early postnatal life*. Respir Physiol Neurobiol, 2005. **149**(1-3): p. 111-122.
  76. Okada, A., et al., *Effect of estrogens on ontogenetic expression of progesterone receptor in the fetal female rat reproductive tract*. Mol Cell Endocrinol, 2002. **195**(1-2): p. 55-64.
  77. Ivanova, T., M. Karolczak, and C. Beyer, *Estradiol stimulates GDNF expression in developing hypothalamic neurons*. Endocrinology, 2002. **143**(8): p. 3175-8.
  78. Ivanova, T., et al., *Estrogen stimulates brain-derived neurotrophic factor expression in embryonic mouse midbrain neurons through a membrane-mediated and calcium-dependent mechanism*. J Neurosci Res, 2001. **66**(2): p. 221-30.
  79. Solum, D.T. and R.J. Handa, *Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus*. J Neurosci, 2002. **22**(7): p. 2650-9.
  80. Nilsen, J., G. Mor, and F. Naftolin, *Estrogen-regulated developmental neuronal apoptosis is determined by estrogen receptor subtype and the Fas/Fas ligand system*. J Neurobiol, 2000. **43**(1): p. 64-78.

81. Beyer, C., et al., *Developmental expression of progesterone receptor isoforms in the mouse midbrain*. Neuroreport, 2002. **13**(6): p. 877-80.
82. Zwain, I.H. and S.S. Yen, *Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain*. Endocrinology, 1999. **140**(8): p. 3843-52.
83. Pezzi, V., et al., *Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **87**(2-3): p. 181-9.
84. Green, S., et al., *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. Nature, 1986. **320**(6058): p. 134-9.
85. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5925-30.
86. Shughrue, P.J., M.V. Lane, and I. Merchenthaler, *Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system*. J Comp Neurol, 1997. **388**(4): p. 507-25.
87. Shughrue, P.J., B. Komm, and I. Merchenthaler, *The distribution of estrogen receptor-beta mRNA in the rat hypothalamus*. Steroids, 1996. **61**(12): p. 678-81.
88. Wang, L., et al., *Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(2): p. 703-8.
89. Wang, L., et al., *Morphological abnormalities in the brains of estrogen receptor beta knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(5): p. 2792-6.
90. Kian Tee, M., et al., *Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(3): p. 1262-72.
91. Benten, W.P., et al., *Estradiol signaling via sequesterable surface receptors*. Endocrinology, 2001. **142**(4): p. 1669-77.
92. Revankar, C.M., et al., *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. **307**(5715): p. 1625-30.
93. Graham, J.D. and C.L. Clarke, *Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells*. Breast Cancer Res, 2002. **4**(5): p. 187-90.
94. Schumacher, M., et al., *Genomic and membrane actions of progesterone: implications for reproductive physiology and behavior*. Behav Brain Res, 1999. **105**(1): p. 37-52.
95. Wei, L.L., et al., *An amino-terminal truncated progesterone receptor isoform, PRc, enhances progestin-induced transcriptional activity*. Mol Endocrinol, 1996. **10**(11): p. 1379-87.
96. Wei, L.L., B.M. Norris, and C.J. Baker, *An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)-DNA binding*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **62**(4): p. 287-97.
97. Vegeto, E., et al., *Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(10): p. 1244-55.
98. McDonnell, D.P. and M.E. Goldman, *RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism*. J Biol Chem, 1994. **269**(16): p. 11945-9.

99. Shyamala, G., et al., *Transgenic mice carrying an imbalance in the native ratio of A to B forms of progesterone receptor exhibit developmental abnormalities in mammary glands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 696-701.
100. Richer, J.K., et al., *Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 5209-18.
101. Maharjan, S., L. Serova, and E.L. Sabban, *Transcriptional regulation of tyrosine hydroxylase by estrogen: opposite effects with estrogen receptors alpha and beta and interactions with cyclic AMP*. J Neurochem, 2005. **93**(6): p. 1502-14.
102. Alberts, B., et al., *Postranscriptional controls*, in *Molecular Biology of The Cell*. 2002, Garland Science, Taylo & Francis Group: New York. p. 435-452.
103. He, L., et al., *Endothelin modulates chemoreceptor cell function in mammalian carotid body*. Adv Exp Med Biol, 1996. **410**: p. 305-311.
104. He, X.R., et al., *Effects of 17beta-estradiol on the baroreflex control of sympathetic activity in conscious ovariectomized rats*. Am J Physiol, 1999. **277**(2 Pt 2): p. R493-8.
105. Uki, M., J. Nabekura, and N. Akaike, *Suppression of the nicotinic acetylcholine response in rat superior cervical ganglionic neurons by steroids*. J Neurochem, 1999. **72**(2): p. 808-14.
106. Mellon, S.H. and L.D. Griffin, *Neurosteroids: biochemistry and clinical significance*. Trends Endocrinol Metab, 2002. **13**(1): p. 35-43.
107. Tsuruo, Y., et al., *Immunocytochemical localization of aromatase-containing neurons in the rat brain during pre- and postnatal development*. Cell Tissue Res, 1994. **278**(1): p. 29-39.
108. Tsuruo, Y., et al., *Immunohistochemical localization of estrogen receptors within aromatase-immunoreactive neurons in the fetal and neonatal rat brain*. Anat Embryol (Berl), 1996. **193**(2): p. 115-21.
109. Miranda, R.C., F. Sohrabji, and D. Toran-Allerand, *Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development*. Horm Behav, 1994. **28**: p. 367-375.
110. Brady, R., et al., *BDNF is a target-derived survival factor for arterial baroreceptor and chemoafferent primary sensory neurons*. J Neurosci, 1999. **19**(6): p. 2131-42.
111. Erickson, J.T., et al., *Mice lacking brain-derived neurotrophic factor exhibit visceral sensory neuron losses distinct from mice lacking NT4 and display a severe developmental deficit in control of breathing*. J Neurosci, 1996. **16**(17): p. 5361-5371.
112. Meis, P.J., et al., *Prevention of recurrent preterm delivery by 17 alpha-hydroxyprogesterone caproate*. N Engl J Med, 2003. **348**(24): p. 2379-85.
113. Kinkead, R., et al., *Neonatal maternal separation enhances dopamine D2-receptor and tyrosine hydroxylase mRNA expression levels in carotid body of rats*. Can J Physiol Pharmacol, 2005. **83**(1): p. 76-84.
114. Joseph, V. and A. Bairam, *Differential regulation of short and long dopamine D2 receptor mRNA levels by hypoxia in the adrenals of 1-day-old and adult rabbits*. Brain Res Mol Brain Res, 2004. **130**(1-2): p. 115-23.
115. Bevitt, D.J., et al., *New monoclonal antibodies to oestrogen and progesterone receptors effective for paraffin section immunohistochemistry*. J Pathol, 1997. **183**(2): p. 228-32.

116. Hrabovszky, E., et al., *Estrogen receptor-beta immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain*. *Endocrinology*, 2001. **142**(7): p. 3261-4.
117. Shughrue, P.J. and I. Merchenthaler, *Distribution of estrogen receptor beta immunoreactivity in the rat central nervous system*. *J Comp Neurol*, 2001. **436**(1): p. 64-81.
118. Turner, K.J., et al., *Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase*. *J Endocrinol*, 2002. **172**(1): p. 21-30.
119. Roby, K.F., et al., *Generation and characterization of antipeptide antibodies to rat cytochrome P-450 side-chain cleavage enzyme*. *Mol Cell Endocrinol*, 1991. **79**(1-3): p. 13-20.
120. L. Delbecchi, D.P., P. Lacasse. *Effect of 17-estradiol on milk production and mammary gland involution in Holstein cows in mid-late lactation*. in *54th Annu. Rec. Meat Conf., vol.II*. 2005.
121. Jiang, Q. and J.B. Wakerley, *The milk-ejection reflex in the peri-partum rat: effects of oestradiol and progesterone on basal milk-ejection frequency and the facilitatory response to central oxytocin*. *J Neuroendocrinol*, 1997. **9**(1): p. 9-16.
122. Bachman, K.C., *Milk production of dairy cows treated with estrogen at the onset of a short dry period*. *J Dairy Sci*, 2002. **85**(4): p. 797-803.
123. Sant'Anna, G.M. and J.P. Mortola, *Thermal and respiratory control in young rats with altered caloric intake during postnatal development*. *Respir Physiol Neurobiol*, 2002. **133**(3): p. 215-27.
124. Okubo, S. and J.P. Mortola, *Long-term respiratory effects of neonatal hypoxia in the rat*. *J Appl Physiol*, 1988. **64**(3): p. 952-8.
125. Okubo, S. and J.P. Mortola, *Control of ventilation in adult rats hypoxic in the neonatal period*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(4 Pt 2): p. R836-41.
126. Mitchell, G.S., M.A. Douse, and K.T. Foley, *Receptor interactions in modulating ventilatory activity*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(5 Pt 2): p. R911-20.
127. Herbst, A.L., et al., *Prenatal exposure to stilbestrol. A prospective comparison of exposed female offspring with unexposed controls*. *N Engl J Med*, 1975. **292**(7): p. 334-9.
128. Henderson, B.E., et al., *Urogenital tract abnormalities in sons of women treated with diethylstilbestrol*. *Pediatrics*, 1976. **58**(4): p. 505-7.
129. Gaultier, C., *Clinical and therapeutic aspects of obstructive sleep apnea syndrome in infants and children*. *Sleep*, 1992. **15**(6 Suppl): p. S36-8.
130. Scheers, N.J., C.M. Dayton, and J.S. Kemp, *Sudden infant death with external airways covered: case-comparison study of 206 deaths in the United States*. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 1998. **152**(6): p. 540-7.
131. Waters, K.A., et al., *Face-straight-down and face-near-straight-down positions in healthy, prone-sleeping infants*. *J Pediatr*, 1996. **128**(5 Pt 1): p. 616-25.
132. Kotz, C.M. and J.A. Levine, *Role of nonexercise activity thermogenesis (NEAT) in obesity*. *Minn Med*, 2005. **88**(9): p. 54-7.