



**Impact des minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes et
de l'hormone thyroïdienne sur le développement
respiratoire de *Lithobates catesbeianus***

Mémoire

Jean-Philippe Rousseau

Maîtrise en neurobiologie
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

© Jean-Philippe Rousseau, 2015

Résumé

L'émergence de la respiration aérienne au cours du développement de l'amphibien demande d'importants changements au niveau du circuit cérébral qui génère et régule le rythme respiratoire. La métamorphose étant influencée par différentes hormones métamorphiques, nous avons testé l'hypothèse proposant qu'exposer le cerveau à ces hormones augmenterait le rythme respiratoire aérien fictif chez les têtards de *Lithobates catesbeianus*. Nous utilisons une technique d'isolation du tronc cérébrale qui est ensuite exposé à différentes hormones, soit l'aldostérone, la corticostérone et l'hormone T3. En comparant les préparations exposées aux hormones sur 24h avec les contrôles, nous démontrons que l'exposition aux hormones augmente de manière générale la respiration aérienne. La ventilation fictive des préparations exposées aux hormones présentait des similarités avec celles provenant d'adultes. Nous concluons que, grâce à leurs effets à long terme, les hormones régulant la métamorphose peuvent déclencher la maturation des circuits neuronaux qui génèrent et régulent la respiration de cette espèce.

Abstract

The emergence of air breathing during amphibian development requires significant changes to the brainstem circuits that generate and regulate breathing. Because this metamorphosis is regulated by metamorphic hormones, we tested the hypothesis that exposing the brainstem to these hormones augments the fictive air breathing frequency in *Lithobates catesbeianus* tadpoles. Brainstems were isolated from pre-metamorphic tadpoles and a hormone exposure was made with the following hormones: aldosterone, corticosterone, T3. By comparison with preparations subjected to sham treatment, hormone exposure generally increased fictive air breathing frequency. Brainstem preparations showed a response to a change in the aCSF pH only before the 24h incubation, suggesting a chemosensitivity lost following the incubation. However, the patterns of the exposed brainstem presented an activity that is reminiscent of those observed in adult frogs. We conclude that hormones play an important role in the maturation of the neural circuits that generate and regulate breathing in this species.

Table des matières

Résumé	III
Abstract	V
Table des matières	VII
Liste de tableaux.....	XI
Liste des figures.....	XIII
Liste des abréviations	XV
Avant-propos	XIX
Chapitre I.....	1
Introduction	1
1. Métamorphose de l'amphibien	3
1.1 Changements morphologiques.....	3
1.2 Échanges respiratoires.....	4
1.2.1 Transition des milieux	4
1.2.2 Respiration Cutanée	6
1.2.3 Respiration branchiale.....	8
1.2.4 Respiration pulmonaire	9
2. Contrôle de la respiration.....	11
2.1 Genèse des rythmes respiratoires.....	13
2.1.1 Localisation des centres de contrôle.....	13
2.1.2 Ontogénie de la rythmogénèse	15
2.1.3 Mécanismes de génération du rythme	16
3. Chemosensibilité de l'amphibien	17
3.1 Chémoréflexe à l'O ₂	17
3.1.1 Respiration aquatique.....	17
3.1.2 Respiration aérienne	19
3.1.3 Chemosensibilité centrale.....	19
3.2 Chémoréflexe au CO ₂	20
3.2.1 Réponse développementale au CO ₂ /pH	20
4. Régulation de la métamorphose.....	22
4.1 Plasticité phénotypique	22

4.2 Régulation endocrinienne centrale.....	23
4.3 Modulation endocrinienne périphérique	25
4.3.1 Glande Thyroïdienne.....	25
4.3.2 Glande surrénale.....	27
4.4 Mode d'action génomiques des hormones.....	28
4.4.1 Homodimères	28
4.4.2 Hétérodimère.....	29
4.5 Mode d'action non-génomique des hormones.....	30
4.6 Remodelage du système nerveux central par le système endocrinien	30
5. Objectif de la recherche.....	31
6. Méthodes générales	31
6.1 La préparation du tronc cérébrale <i>in vitro</i>	31
6.2 Avantages du tronc cérébral isolé de l'amphibien.....	33
6.2.1 Une préparation robuste	33
6.2.2 Similarité in-vivo / in-vitro	34
Chapitre II	35
Aldosterone, corticosterone, and thyroid hormone and their influence on respiratory control development in <i>Lithobates catesbeianus</i> ; an <i>in vitro</i> study	35
Résumé	37
Abstract.....	38
1. Introduction	39
2. Methods	42
2.1 Animals	42
2.2 <i>In vitro</i> brainstem preparations	42
2.3 Electrophysiological recordings.....	43
2.4 Experimental protocols	43
2.4.1 Series I: effects of acute (1h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency.....	44
2.4.2 Series II: effects of chronic (24h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency	45
2.4.3 CO ₂ /pH chemosensitivity test	46
2.4.4 Adult frogs.....	46

2.5 Data analysis	46
3. Results	48
3.1 Effects of acute (1h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency.....	48
3.2 Effect of chronic (24h) incubation under control condition (no hormone) on neurorespiratory activity	48
3.3 Effects of chronic (24h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency.....	49
3.4 CO ₂ /pH chemosensitivity test	50
4. Discussion.....	59
4.1 Critique of methods.....	59
4.2. Time-dependent effects of hormones on respiratory control maturation.....	61
4.3 Putative mechanisms.....	61
5. Conclusion and perspectives.....	62
6. Acknowledgements.....	63
Chapitre III	65
Discussion	65
1. La désinhibition : un mécanisme complémentaire	67
1.1 La maturation du système GABAergique.....	68
1.1.1 Maturation du système GABAergique à travers le développement	68
1.1.2 Régulation endocrinienne du système GABAergique.....	70
1.2 Les Rhombomères.....	71
2. La chémosensibilité	72
2.1 Le CO ₂ en tant que stimulus à travers le développement	72
2.2 Implication de la chémosensibilité périphérique dans la réponse ventilatoire	73
3. Influence du sexe sur la réponse respiratoire.....	74
3.1 Régulation de l'axe du stress	74
3.2 Détermination du sexe chez le têtard pré-métamorphique.....	75
4. Approches alternatives.....	77
4.1 La méthode «Sheep-Dip».....	77
4.2 La technique «Split-bath»	78

4.3 Liens potentiels avec notre protocole	79
5. Perspectives futures et retombées dans la recherche clinique	80
5.1 Homologie du système de contrôle de la respiration : Amphibien vs Mammifères	80
5.2 Un apport de l'étude à la recherche clinique?	81
5.3 Perspectives futures	83
Bibliographie	85
Annexe	97

Liste de tableaux

Tableau 1.1 : L'eau et l'air comme milieux respiratoires.

Tableau 2.1: Measurement of pH, PO₂ and PCO₂ of aCSF in the bottle containing the tadpole brainstem before and after incubation.

Liste des figures

Figure 1.1: Cycle vital de la grenouille.

Figure 1.2: Variation dans la consommation d'O₂, l'élimination du CO₂ et dans le ratio des échanges gazeux, R (CO₂ /O₂), de la peau, des branchies et des poumons chez *Lithobates catesbeianus* à 20°C.

Figure 1.3: Mécanisme de la respiration branchiale chez le têtard. Représentation des pompes actives ainsi que les cavités mises en jeu.

Figure 1.4: Étapes successives du cycle ventilatoire avec les mouvements de l'air à travers les compartiments chez *Lithobates catesbeianus*.

Figure 1.5: Respiration épisodique enregistrée chez une grenouille adulte.

Figure 1.6 : Signaux intégrés d'un enregistrement de tronc cérébrale isolée d'un têtard pré-métamorphique de *Lithobates catesbeianus* présentant l'activité respiratoire des nerfs VII (facial) et X (vague).

Figure 1.7: Tronc cérébrale isolé de *Lithobates catesbeianus* comportant les régions responsables de la respiration pulmonaire et branchiale/buccale.

Figure 1.8 : Représentation schématique de l'axe HPA et HPT ainsi que les mécanismes d'intégration centrale et périphérique de l'axe du stress et de l'axe thyroïdien dans le contrôle de la métamorphose de l'amphibien.

Figure 1.9 : Niveau des hormones thyroïdiennes et des récepteurs thyroïdiens au cours du développement de *Xenopus laevis*.

Figure 1.10 : Principal mode d'action génomique des corticostéroïdes. Méthode de transactivation et de transrépression.

Figure 1.11 : Préparation de tronc cérébral isolé de *Lithobates catesbeianus*. Enregistrement électrophysiologique de l'activité respiratoire à partir des nerf trijumeau et vague.

Figure 1.12 : Enregistrement électrophysiologique de la respiration épisodique chez *Lithobates catesbeianus* au stade adulte. Enregistrement effectué sur le nerf trijumeau.

Figure 2.1: Schematic representation of the time course of the experimental protocols used to assess the effects of acute (1h) and chronic (24h) application of mineralocorticoid, glucocorticoid and thyroid hormone on fictive gill and lung breathing frequencies.

Figure 2.2: Effects on lung and gill burst frequencies of an acute (1h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with aldosterone, corticosterone or T3.

Figure 2.3: Effects on lung and gill burst frequencies of an acute (1h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with T3 + aldosterone.

Figure 2.4: Changes in lung and gill burst frequencies before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with aldosterone, corticosterone or T3.

Figure 2.5: Changes in lung and gill burst frequencies before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with T3 + aldosterone or T3 + corticosterone.

Figure 2.6: The effects on lung and gill burst frequencies of changing aCSF pH in tadpole and adulte brainstems before and after the 24h incubation in sham conditions (aCSF alone).

Figure 2.7: Comparison of fictive lung breathing between the tadpoles exposed to sham aCSF, T3 + aldosterone for 24h and the adulte exposed to sham aCSF. The values are compared to the mean lung ventilation in the entire adult animal breathing.

Figure 2.8: The % of tadpole preparations with episodic lung bursts before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to sham aCSF (time control) or aCSF with hormones.

Figure 2.9: Comparison of the number of brainstem preparations without the “gill-related” bursting in the Xth nerve following the 24h incubation in sham aCSF (time control) or aCSF with hormones.

Figure 3.1 : Changements développementaux de la $[Cl^-]_i$ déterminés par l’expression des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 dans les neurones immatures et matures.

Figure 3.2 : Testicules (1-3) et ovaires (4-6) recueillis chez *Lithobates catesbeianus* au stade III (1 et 4), au stade XX (2 et 5) et deux mois après la métamorphose (3 et 6). Grossissement : 1.5X

Figure 3.3 : Technique d’enregistrement électrophysiologique Shepp-Dip. Les neurogrammes représentent l’activité respiratoire fictive enregistrée à partir des nerfs crâniens Trijumeau (V) et Facial (VII).

Figure 3.4 : Technique d’enregistrement électrophysiologique «Split-bath». La bande noire représente la barrière séparant la chambre d’enregistrement en deux compartiments non connectés.

Liste des abréviations

aCSF : artificial Cerebo-spinal fluid

ACTH : Hormone adénocorticotropique

CRF : Agent de libération de la corticotropine

GR : Récepteur Glucocorticoïde

HPA : Hypothalamus - Hypophyse - Glandes surrénales

HPT : Hypothalamus - Hypophyse - Glande thyroïdienne

LCRa : Liquide Céphalo-Rachidien artificiel

MR : Récepteur minéralocorticoïde

pBc : Complexe pré-Bötzinger

pFRG : Groupe respiratoire para-facial

TSH : Hormone stimulant la glande thyroïdienne

TH : hormone thyroïdienne

Le biologiste passe, la grenouille reste
Jean Rostand (1967)

Avant-propos

Le second chapitre de ce mémoire contient un article soumis pour publication au journal *Respiratory Physiology and Neurobiology* en date du 18 septembre 2014. Cet article fait état de trois auteurs : moi-même, Jean-Philippe Rousseau, étudiant à la maîtrise en neurobiologie, Aida Bairam, ma co-directrice de recherche et Richard Kinkead, mon directeur de recherche. Je suis le premier auteur de cet article, puisque j'ai contribué à l'élaboration du projet, j'ai effectué la majorité des manipulations ainsi que la totalité des analyses, j'ai conçu chacune des figures et j'ai rédigé la majeure partie du manuscrit. Le Dr. Bairam nous a fournis de précieux conseils pour l'élaboration du manuscrit et a aidé avec la correction de ce dernier. Le Dr. Kinkead a contribué à l'élaboration du projet ainsi qu'à la conception du manuscrit et des figures. Ses importantes corrections ont aussi amélioré grandement la qualité de la publication.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr. Richard Kinkead pour son chaleureux accueil au sein de son laboratoire m'ayant permis d'effectuer un projet d'initiation à la recherche dans le cadre de mon baccalauréat en Biologie. J'ai ainsi pu découvrir pour la première fois l'univers de la recherche ainsi que les techniques utilisées dans les nombreuses tâches du projet. C'est grâce à lui que j'ai développé ma passion pour la recherche tant par son aide précieuse tout au long de mon cheminement, mais aussi par sa grande écoute, sa générosité, sa disponibilité et sa détermination à me faire découvrir la neurobiologie par nos discussions captivantes ainsi que ses réponses éclairées à mes multiples questions. Ses qualités de chercheur constituent une des principales raisons pour laquelle je tiens à continuer mon aventure au doctorat au sein de son laboratoire puisque j'estime que j'ai encore beaucoup à apprendre du Dr. Kinkead et son équipe. J'aimerais aussi remercier mes collègues de laboratoire qui ont contribué à ma réussite dans la réalisation de ce mémoire : Stéphanie Fournier et Roumiana Gulemetova pour leur savant conseil dans l'élaboration du projet et l'apprentissage des techniques d'enregistrement et d'analyse de données, Céline Caravagna, François Marcouiller, Orlane Rossignol, Cécile Baldy et Sofien Laouafa pour leur précieux conseils ainsi que les agréables conversations que j'ai eu au cours

de ma formation, Mélanie Pelletier pour les soins apportés aux grenouilles et finalement, mes amis qui m'ont encouragé et poussé à compléter ma formation et mes études au niveaux supérieurs.

Pour conclure, j'aimerais remercier mes parents qui, depuis le début, m'ont supporté par tous les moyens possibles et ce, tout au long de mon cheminement. Vous rendre fier est la principale raison qui m'a permis de persévérer au cours de toutes mes années de formation et je compte bien continuer d'exceller afin de pouvoir voir ce sourire réconfortant sur votre visage lorsque je vous parle de mes accomplissements. Je ne pourrais finir ce chapitre sans remercier ma compagne et amour Audrey Cardinal, pour la joie que tu as apporté dans ma vie et le soutien que tu m'apportes lorsque je rentre à la maison. Tu es ma confidente et ma source de réconfort lorsque je traverse les périodes difficiles de mon cheminement.

Chapitre I

Introduction

1. Métamorphose de l'amphibien

1.1 Changements morphologiques

En jetant un œil sur l'évolution générale des espèces, il est possible de remarquer chez plusieurs taxons une importante période de changements drastiques qui s'étendent sur une très courte durée permettant à l'animal de passer d'une forme à l'autre. Un des exemples le plus connu et aussi le plus spectaculaire est retrouvé dans le groupe des amphibiens. Au cours de leur cycle de vie, les grenouilles subissent d'importants changements morphologiques et physiologiques leur permettant de passer du milieu aquatique vers le milieu terrestre afin d'exploiter des nouvelles ressources (Werner, 1986) (Fig. 1.1). Cette transition est engendrée par une importante période de développement appelée métamorphose où la croissance de l'animal semble être stoppée. Ce dernier doit donc mettre l'emphase sur sa croissance lors du stade larvaire afin d'assurer une rapide expansion de son poids corporel dans une niche écologique qui est temporaire. Cette opportunité d'expansion sera un important facteur pour la survie de l'animal dans son cycle de vie tant par ses interactions avec les prédateurs que par sa réaction face à des changements environnementaux tels que la dessiccation de l'étang (Denver, 1997a).

Grâce à la publication de Taylor et Kollros (1946) : stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae, nous avons une très bonne description du développement de l'animal post-éclosion, présenté dans l'article par les 25 étapes décrivant la morphologie du stade larvaire vers la grenouille adulte. L'apparition des membres débute avant la métamorphose, au cours de la période encore aquatique du têtard. Ce sont tout d'abord les membres postérieurs qui apparaissent au cours de la vie aquatique. Une fois la formation des membres postérieurs complétée, les pattes antérieures qui se sont formées sous la peau émergent. Une fois la transition vers le milieu aérien effectuée, la queue régresse et le stade adulte est atteint. L'ensemble de ces transformations morphologiques permettent des changements au niveau de la locomotion dans la transition du milieu aquatique vers terrestre.

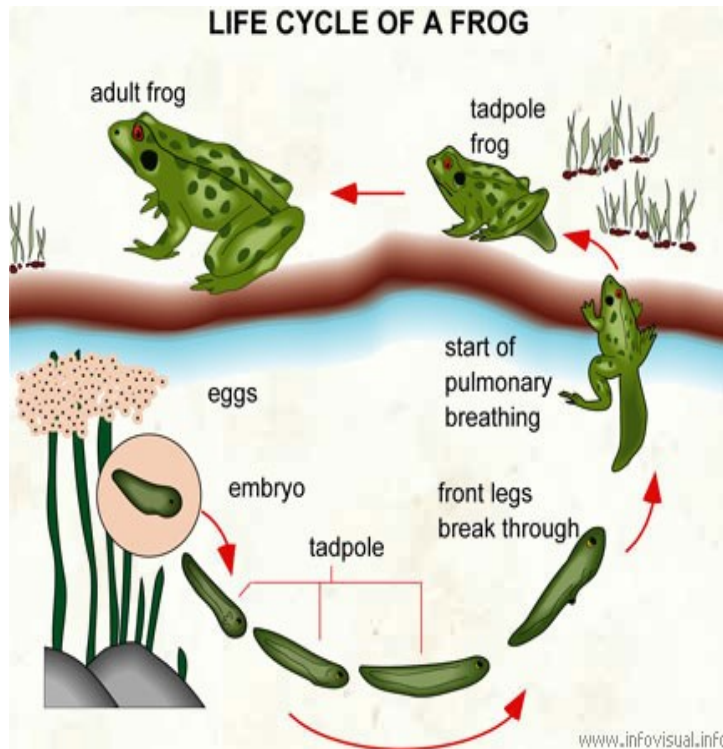


Figure 1.1 : Cycle vital de la grenouille. Tiré de Déry, 2006.

1.2 Échanges respiratoires

1.2.1 Transition des milieux

Les changements morphologiques au cours de la métamorphose ne sont pas seulement observés au niveau de l'anatomie externe de la grenouille, mais sont aussi présent dans le système respiratoire de l'amphibien. En effet, la transition du milieu aquatique vers le milieu terrestre demande d'importantes modifications de la machinerie respiratoire considérant les caractéristiques physico-chimiques différentes de l'oxygène et du dioxyde de carbone entre les deux milieux. Ces différences sont montrées dans le tableau 1.1 ci-dessous. On retrouve l'oxygène en concentration nettement plus élevée dans l'air que dans l'eau ($\pm 30X$) et son taux de diffusion est aussi plus rapide dans l'air ($\pm 300.000X$). La densité de l'air ainsi que sa viscosité sont aussi nettement inférieures à celles de l'eau (Ancitil et al., 2006). Il est donc beaucoup plus facile de déplacer une certaine quantité d'air qu'une même quantité d'eau.

L'oxygène est donc beaucoup plus disponible dans l'air et son accès est nettement plus aisé.

	Eau	Air	Rapport eau/air
Concentration en O ₂ (mL/L)	7	209	~1/30
L milieu/L O ₂	143	4.8	~30/1
Kg milieu/L O ₂	143	0.0062	~2300/1
Densité (Kg/L)	1	0.0013	~800/1
Viscosité (cP)	1	0.02	~50/1

Tableau 1.1 : L'eau et l'air comme milieux respiratoires. Tiré de Ancil et al., 2006

On observe cependant que la respiration aérienne résulte en une accumulation de CO₂ au niveau du sang plus importante que la respiration aquatique (Ancil et al., 2006). Ce haut niveau de CO₂ serait engendré par la ventilation réduite au cours de la respiration aérienne. Puisque l'oxygène est plus facile à acquérir dans l'air, l'animal peut diminuer sa ventilation afin d'avoir les même taux d'O₂ sanguin. Cette diminution de la ventilation créer cependant une augmentation du CO₂ dans l'organisme puisque le métabolisme lui ne diminue pas pour autant sa production de CO₂ avec la respiration terrestre. De plus, l'élimination du CO₂ se fait plus aisément dans l'eau que dans l'air, car une bonne part du CO₂ peut être éliminée sous forme de HCO₃⁻ chez les organismes aquatiques. Les études chez *Lithobates catesbeianus* ont effectivement démontré une P_{CO2} trois fois supérieure dans le sang lors du passage vers la respiration aérienne (Erasmus, 1970). On peut conclure ici que l'air est un milieu moins favorable pour l'élimination du CO₂ que l'eau. Pour les animaux terrestres, le principal défi au niveau de la respiration est d'assurer une élimination adéquate du CO₂, tandis que l'animal aquatique doit pour sa part s'assurer un accès optimal à l'oxygène qui est une ressource limitée dans l'eau. Ces deux particularités expliquent le besoin de la transition du système de respiration branchial chez le têtard vers le système de respiration pulmonaire de la grenouille adulte avec la métamorphose et la conquête du milieu terrestre.

Il est connu que le têtard possède plusieurs sites d'échanges gazeux : la peau, les branchies et les poumons. Cependant, puisque les têtards se situant dans les premiers stades du développement possèdent un rapport surface/volume très élevé, la peau et les branchies constituent les deux principaux sites d'échanges gazeux (Burggren and West, 1982; Burggren and Doyle, 1986). Même si les poumons sont présents, ces derniers sont immatures et ne contribuent pas encore aux échanges gazeux puisque la formation des alvéoles pulmonaires et leur vascularisation ne sont pas arrivées à terme (Bartel & Lametschwandtner, 2000). Néanmoins, les signaux mécaniques d'étirements pulmonaires produits par les mouvements respiratoires aident au développement des poumons (Crowder et al., 1998). En effet, des bouffées d'air ont été enregistrées chez des têtards de très jeunes stades (TK stade 4) (Torgerson et al., 1997). Avec la maturation de l'animal, les branchies régressent et les poumons deviennent la principale source d'échange gazeux (Straus et al., 2000). Une augmentation de la taille de la grenouille entraîne une diminution de son rapport surface/volume, ce qui affecte le taux de diffusion par la peau et les branchies, rendant ces deux mécanismes insuffisants pour répondre aux besoins d'échanges gazeux. Nous avons donc avec une maturation de l'animal et un changement de l'environnement, une modification des mécanismes respiratoires ainsi qu'une prédominance des poumons comme site d'échange gazeux chez l'adulte.

1.2.2 Respiration Cutanée

La peau exerce une multitude de fonctions : protection, support, locomotion, thermorégulation, et communication (Feder and Burggren, 1985). Elle peut cependant être aussi considérée comme un site d'échange gazeux, car tout comme les parois des branchies et des poumons, une diffusion de l'oxygène et du CO₂ est observée au niveau de la peau. Le mécanisme de respiration cutanée est dit passif par la diffusion des gaz à travers la peau vers les capillaires périphériques. Ce dernier dépend beaucoup du ratio surface/volume ainsi que du nombre de vaisseaux sanguins recrutés (Feder and Burggren, 1985). Chez l'amphibien, la structure de la peau maximise la diffusion des gaz grâce à une absence de poils, de plumes ou toute autre barrière cutanée, grâce à un épiderme très fin (typiquement 10-50 µm) ainsi qu'un

important ratio de vaisseaux sanguins résidants dans la peau. La respiration cutanée est le principal site d'échange gazeux dans les premiers stades de développement de l'amphibien. Grâce au large ratio surface/volume en partie comblé par la section de la queue ainsi qu'une importante vascularisation, la peau du têtard dont le mode de vie est strictement aquatique contribue à 60 % de l'acquisition d'oxygène. Avec l'avancé du développement, les poumons prennent le dessus sur les branchies au niveau de l'acquisition d'oxygène, mais la peau reste le principal système d'obtention d'oxygène jusqu'à la complétion de la métamorphose (Burggren and West, 1982). Contrairement aux nombreuses variations observées dans l'acquisition de l'oxygène par les différents sites d'échanges gazeux au cours du développement de l'amphibien, l'excrétion de CO₂ est effectuée en majorité (60%) par la peau au cours du cycle de vie entier de la grenouille. Suite à la métamorphose, les poumons vont combler 80% de l'obtention d'oxygène des adultes, mais leur contribution à l'excrétion de CO₂ ne dépassera jamais les 20% (Burggren and West, 1982) (Fig. 1.2).

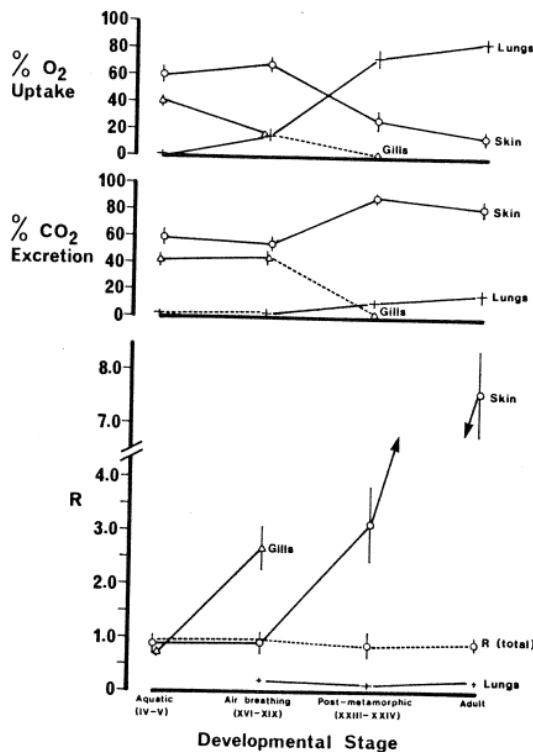


Figure 1.2 : Variation dans la consommation d'O₂, l'élimination du CO₂ et dans le ratio des échanges gazeux, R (CO₂ /O₂), de la peau, des branchies et des poumons chez *Lithobates catesbeianus* à 20°C. Tiré de Burggren & West, 1982.

1.2.3 Respiration branchiale

La respiration branchiale du têtard est très similaire à la respiration observée chez le poisson. Le système respiratoire est composé de quatre arcs branchiaux situés de chaque côté de la tête séparant ainsi la cavité buccale de la cavité operculaire. Chaque arc possède deux rangées de filaments et chaque filament a une rangée supérieure et inférieure de lamelles. Afin de former un tamis assurant ainsi un contact maximal avec l'eau, chaque lamelle d'une rangée successive de filaments est très proche de sa voisine et les bouts des filaments de chaque arc adjacent sont juxtaposés. Une couche de mucus recouvre les branchies dans le but de les protéger et aider à la liaison entre l'eau et l'épithélium (Eckert, 1999).

Contrairement à la respiration cutanée, la respiration branchiale est considérée comme un système actif d'échange gazeux puisqu'elle nécessite un mécanisme de pompe afin d'irriguer les branchies (Fig. 1.3). Deux types de pompes musculaires sont utilisés dans le cycle respiratoire : la pompe buccale et la pompe pharyngienne. La phase d'irrigation peut être divisée en deux parties : l'inspiration et l'expiration. Dans le cycle inspiratoire, l'animal débute en ouvrant la bouche et les narines, mais la pression buccale reste trop importante pour que l'eau puisse entrer. Ce dernier devra procéder à une expansion de sa cavité buccale pour créer une diminution de la pression, ce qui engendre une entrée d'eau par la bouche et les narines. À cette étape, la structure qui se nomme velum et qui sépare la cavité buccale de la cavité pharyngienne reste fermée par la pression initialement présente dans le pharynx. Cette pression est due à une compression que ce dernier a effectuée pour pousser l'eau déjà contenue dans la cavité pharyngienne vers les branchies. Suite au remplissage de la cavité buccale, le têtard procède à la phase d'expiration du cycle respiratoire. Le têtard ferme la bouche et soulève le plancher buccal. Cette élévation produit une pression positive dans la cavité buccale, ce qui engendre la fermeture des narines ainsi que l'ouverture du velum reliant la cavité pharyngienne à la cavité buccale. L'augmentation de la pression force l'eau à passer à travers le pharynx puis les branchies et le processus d'échange gazeux est démarré (Gradwell, 1972).

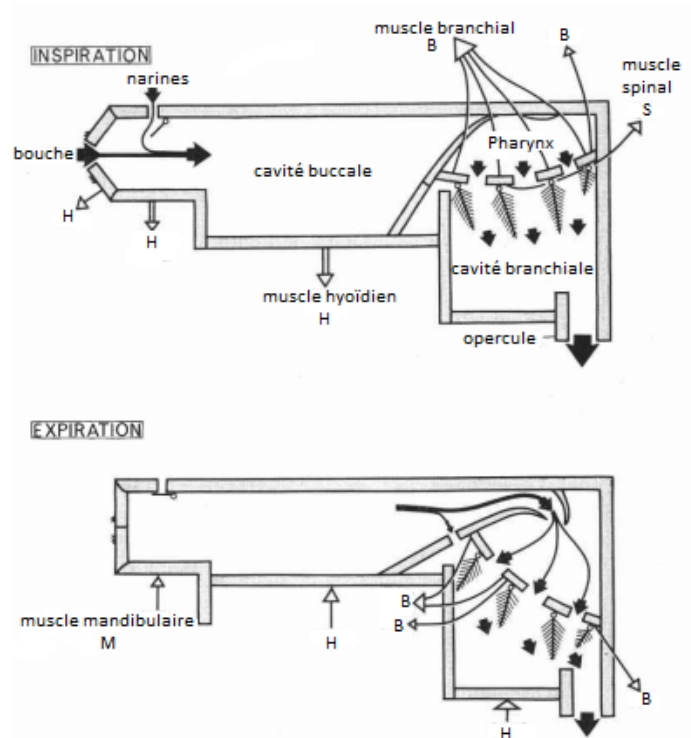


Figure 1.3 Mécanisme de la respiration branchiale chez le têtard. Représentation des pompes actives ainsi que les cavités mises en jeu. Modifié de Gradwell, 1972.

1.2.4 Respiration pulmonaire

La respiration aérienne des grenouilles adultes diffère de celle des vertébrés supérieurs puisqu'elle utilise un mécanisme de compression de l'air (pression positive) plutôt qu'une aspiration (pression négative). Dans le cas des mammifère, les muscles intercostaux et le diaphragme sont contractés afin d'augmenter le volume de la cavité thoracique. Cette augmentation du volume diminue la pression intrapulmonaire sous la valeur atmosphérique, ce qui déclenche une entrée d'air dans les poumons afin d'égaliser la pression. Lors de l'expiration, les muscles et le diaphragme se relâchent diminuant ainsi le volume de la cavité thoracique et des poumons, poussant alors l'air hors des poumons par une augmentation de la pression de ces derniers (Hickman et al., 2008). Pour sa part, la grenouille respire selon un jeu de pression où ils forcent l'air à entrer dans les poumons grâce à l'activité des muscles de la cavité buccale (Hickman et al., 2008). L'activité respiratoire est divisée en deux cycles chez l'adulte (Gans et al., 1969; Vasilakos et al., 2005). Le premier

cycle, ou cycle oscillatoire, se déroule avec les narines ouvertes et la glotte fermée où l'air est forcé tour à tour à l'intérieur et à l'extérieur de la cavité buccale par les contractions du plancher buccal (Fig. 1.4, case 1). Le second cycle nommé cycle ventilatoire vient interrompre les mouvements buccaux afin d'ouvrir la glotte lorsque le plancher buccal est abaissé. L'air expulsé (vicié) des poumons, qui possède à ce moment une pression supérieure à la pression atmosphérique, entre dans la cavité buccale et passe au-dessus de l'air oxygéné pour ensuite sortir par les narines (Fig. 1.4, case 2). Les narines sont ensuite fermées et une compression des muscles du plancher buccal augmente la pression de la cavité, entraînant ainsi l'air oxygéné de la cavité buccale vers les poumons (Fig. 1.4, case 3). La glotte est refermée au pic de la compression buccale afin de toujours garder la pression à l'intérieur des poumons supérieure à la pression atmosphérique. Finalement, le plancher buccal est rabaissé avec les narines ouvertes pour recommencer le cycle respiratoire (Fig. 1.4, case 4) (Gans et al., 1969).

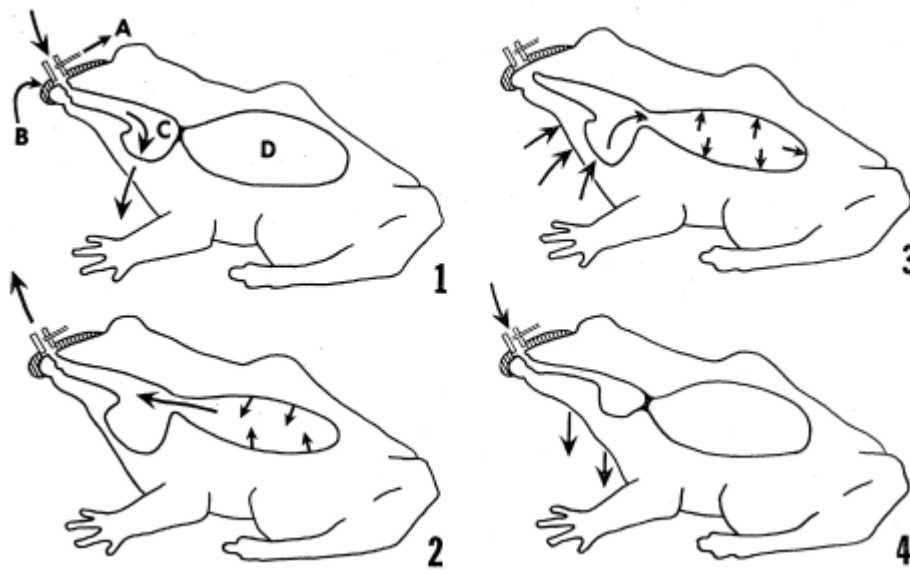


Figure 1.4 : Étapes successives du cycle ventilatoire avec les mouvements de l'air à travers les compartiments chez *Lithobates catesbeianus*. Tiré de Gans et al., 1969

2. Contrôle de la respiration

Le système de contrôle respiratoire a comme rôle de diriger et réguler la convection de l'air ou de l'eau vers les structures d'échange gazeux dans le but ultime de maintenir des niveaux d'O₂ et de CO₂ sanguins relativement constants. Pour ce faire, la majorité des vertébrés supérieurs procèdent à une alternation rythmée et sans interruptions entre les inspirations et expirations. Les amphibiens pour leur part, utilisent une respiration épisodique où la ventilation des poumons est regroupée en épisodes comportant de nombreuses bouffées respiratoires séparées par des périodes non-ventilatoires (apnée) de durées variables (Kinkead, 1997) (Fig. 1.5). Il a été supposé que cette genèse d'épisodes respiratoires était due à l'oscillation seule du taux d'O₂ ou CO₂/pH sanguin, tous deux associés à la respiration intermittente (Shelton and Croghan, 1988). Cependant, cette hypothèse a été réfutée par l'utilisation de la ventilation unidirectionnelle chez l'amphibien, technique qui permet d'éliminer toute fluctuation des gaz sanguins ainsi que du pH sanguin. L'animal, dépourvu de toute fluctuation des gaz et du pH sanguin, produisait malgré tout un rythme respiratoire épisodique supportant l'hypothèse que les chémorécepteurs phasiques, connus pour leur réponse rapide à un stimulus, jouent un plus petit rôle qu'on le pensait dans le contrôle du rythme respiratoire. Ces résultats supportent la possible action d'un générateur central double de rythme contrôlant la respiration (voir ci-dessous) selon les influx provenant des récepteurs périphériques et centraux, qui détectent les fluctuations des gaz et du pH sanguin et du liquide céphalo-rachidien respectivement (Kinkead and Milsom, 1994).

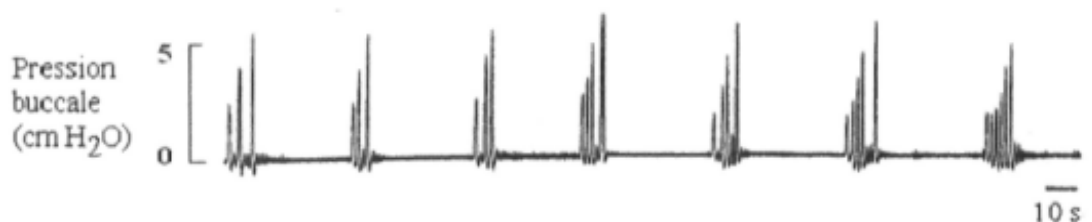


Figure 1.5 : Respiration épisodique enregistrée chez une grenouille adulte. Tirée de Belzile et al., 2004

Chez *Lithobates catesbeianus*, les principaux nerfs crâniens responsables de la respiration par la coordination des muscles respiratoires sont le nerf V (trijumeau) et le nerf VII (facial), tous deux responsables du contrôle de la cavité buccale, le nerf X (vague), responsable du contrôle de la glotte ainsi que le nerf XII (Hypoglosse), innervant les muscles de la langue et la cavité buccale. Nous retrouvons deux types d'activités respiratoires provenant de la décharge de ces nerfs (Fig. 1.6). L'activité reliée à la respiration branchiale est caractérisée par une haute fréquence et basse amplitude de contraction de la pompe buccale. Cette dernière est présente aux stades précoces du développement en tant que respiration branchiale et se transforme avec la métamorphose en respiration buccale où la grenouille remplit d'air la cavité buccale entre les respirations (Smatresk 1990). Dans le cas de l'activité pulmonaire, la force de poussée de l'air vers les poumons est nettement supérieure à la force demandée pour les oscillations buccales. Nous observons donc une amplitude de décharge des nerfs plus importante, mais une fréquence plus basse que l'activité branchiale (Vasilakos et al., 2006).

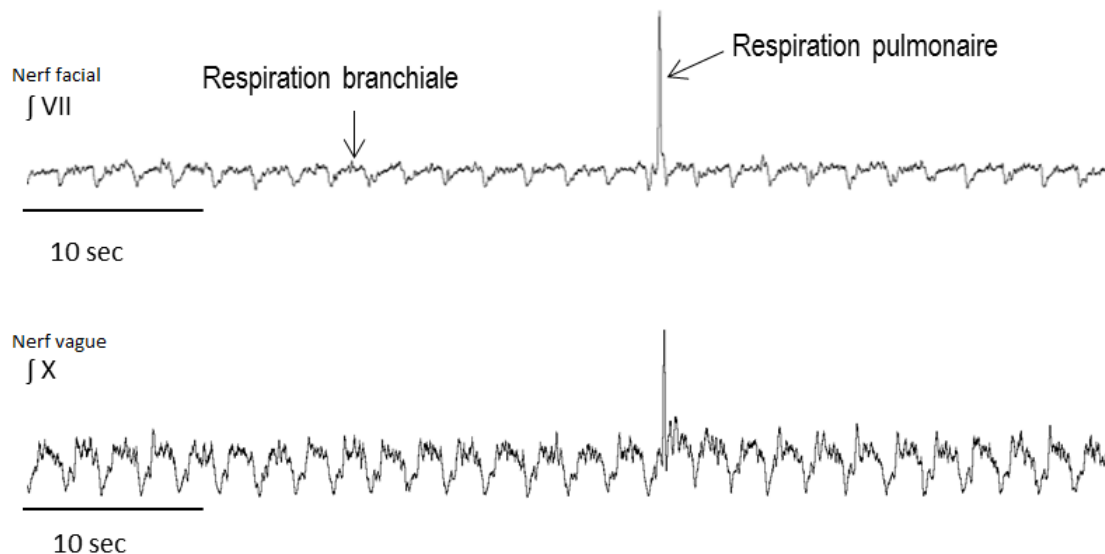


Figure 1.6 : Signaux intégrés d'un enregistrement de tronc cérébrale isolée d'un têtard pré-métamorphique de *Lithobates catesbeianus* présentant l'activité respiratoire des nerfs VII (facial) et X (vague).

2.1 Genèse des rythmes respiratoires

La ventilation de l'amphibien est à la base produite par les muscles qui effectuent les déplacements de l'air ou de l'eau dans les appareils respiratoires. Cette activation appropriée des muscles afin de produire une convection adéquate du médium nécessite une commande motrice de la part des circuits neuronaux qui génèrent le rythme respiratoire (Feldman and McCrimmon, 2003). Un important regroupement de ces circuits neuronaux est situé dans une région distincte du système nerveux central de l'amphibien, le tronc cérébral.

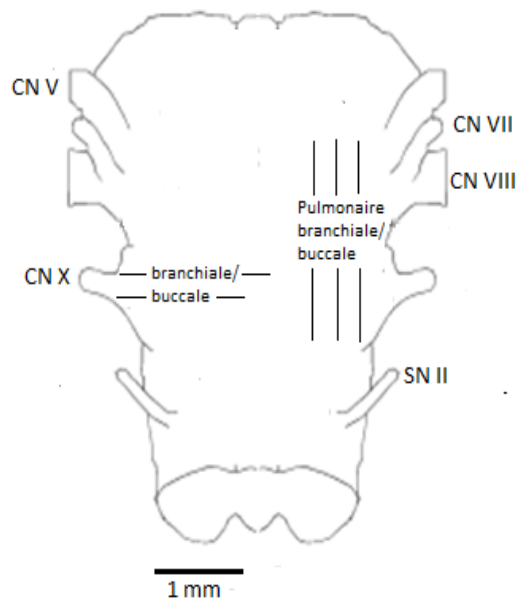
2.1.1 Localisation des centres de contrôle

Grâce aux données provenant de modèles *in-vitro* et *in-vivo*, il a été amplement démontré chez les mammifères que le complexe pré-Bötzinger (pre-Bötzinger complex; pBc) est une des structures cruciales à la génération des rythmes respiratoires (Gray et al., 2001; Wenninger et al., 2004). Le pBc contient des neurones de type «pacemaker» actifs durant la phase inspiratoire de la respiration (Feldman and Del Negro, 2006). Ce complexe a longtemps été considéré comme la seule source du rythme respiratoire jusqu'à ce que des récentes études proposent un second générateur de rythme, le groupe respiratoire para-facial (parafacial respiratory group; pFRG). Cette structure contiendrait des neurones pré-inspiratoires (pre-I) qui seraient inhibés au cours de l'inspiration et débuteraient leur décharge pendant la phase post-inspiratoire et au début de l'expiration. Ces neurones interagiraient donc avec le complexe pBc créant un réseau synaptique couplé afin de produire le rythme respiratoire (Janczewski et al., 2002; Feldman and Del Negro, 2006).

Chez l'amphibien, la région précise du tronc cérébral responsable de la génération du rythme est moins connue. L'utilisation de multiples techniques d'enregistrements ou de micro-injections a cependant permis de définir deux régions potentiellement responsables du rythme respiratoire : un site caudal se situant au niveau du nerf vague (X) régulant la respiration branchiale/buccale ainsi qu'un site plus rostral entre les nerfs crâniens VIII et XII régulant la respiration pulmonaire et branchiale/buccale (Fig. 1.7). Lorsque les deux sites ont été séparés physiquement par sectionnement, les deux sections du tronc cérébral caudale et rostrale ont toutes deux

été capables de générer un rythme respiratoire (Wilson et al., 2002). Ce double jeu d'oscillateurs rappelle l'interaction entre le pBc et le pFRg des mammifères, nous permettant de supposer que l'association entre deux oscillateurs générateurs de rythme pourrait être conservée au cours de l'évolution, présentant ainsi des mécanismes homologues entre les mammifères et les amphibiens (Vasilakos et al., 2005). De plus, des résultats obtenus récemment par la méthode de «sheep-dip» suggèrent une possible division du site rostral contrôlant la ventilation pulmonaire. Cette zone serait divisée en deux entités fonctionnelles et distinctes, soit une composante d'amorçage ainsi qu'une composante de force qui utilisent chacune des mécanismes différents de rythmogénèse (Duchcherer and Wilson, 2008). Ce concept est similaire à celui des mammifères où les neurones inspiratoires et pré-inspiratoires sont à proximité l'un de l'autre, mais présentent des caractéristiques différentes malgré tout (Kinkead et al., 2009).

Figure 1.7: Tronc cérébrale isolé de *Lithobates catesbeianus* comportant les régions responsables de la respiration pulmonaire et branchiale/buccale. Tiré de Wilson et al., 2002



2.1.2 Ontogénie de la rythmogénèse

Un passage de l'eau vers l'air ne demande pas seulement un changement des structures respiratoires, mais aussi une modification du système de contrôle de la respiration. En effet, les études démontrent que l'émergence de la pompe d'aspiration demande une réorganisation fonctionnelle et anatomique de la liaison entre les neurones du tronc cérébral qui génèrent le rythme respiratoire, les neurones moteurs ainsi que les muscles respiratoires (Wilson et al., 2006; Milsom, 2008).

Dans le cas du circuit générateur de la ventilation pulmonaire, Torgerson propose une relocalisation des centres de contrôle avec le développement (Torgerson et al., 2001a). Ce dernier a démontré que la région caudale (au niveau du nerf X) du tronc cérébral d'amphibien pré-métamorphique génère un rythme respiratoire qui n'est pas influencé par la région rostrale. Au stade post-métamorphique, cette fonction est occupée par la zone rostrale du tronc cérébral (au niveau des nerfs crâniens VIII et XII). Le générateur de rythme de la ventilation pulmonaire se déplacerait d'une position caudale du tronc cérébral au stade pré-métamorphique de l'amphibien, vers une position plus rostrale une fois la métamorphose complétée. En effet, la rythmogénèse respiratoire observée à partir d'un segment caudal d'une préparation de tronc cérébral isolé d'un têtard pré-métamorphique disparaissait lorsque le segment provenait d'une préparation d'amphibien post-métamorphique. Le générateur de rythme central de ce segment aurait donc été perdu avec la métamorphose. Il est cependant encore difficile de savoir si le repositionnement rostral de la fonction de rythmogénèse au cours de la métamorphose représente un mouvement développemental des neurones générateurs de rythme ou un recrutement de nouveaux neurones afin de former un circuit rythmique (Torgerson et al., 2001a).

Cette conception de l'ontogénie du générateur de rythme a cependant été contredite par les résultats de Duchcherer. Ce dernier a démontré grâce à l'inhibition de certaines zones du tronc cérébral que les têtards pré-métamorphiques possédaient des éléments nécessaires à la génération du rythme respiratoire pulmonaire situés au niveau rostral du nerf crânien X (Duchcherer et al., 2013). Chez les têtards post-

métamorphiques, ces éléments sont retrouvés dans une zone similaire au niveau du nerf crânien VII. Il y aurait donc un maintien du site de rythmogénèse au cours du développement, ce qui vient contredire l'hypothèse de la migration rostral des éléments générateurs de rythme. Il en serait de même pour l'oscillateur buccal qui resterait au niveau du nerf crânien X à travers le développement (Duchcherer et al., 2013).

2.1.3 Mécanismes de génération du rythme

Au cours de l'étude de la formation du rythme respiratoire chez les vertébrés, deux hypothèses expliquant cette génération ont été proposées : 1) une interaction entre les réseaux de neurones qui demande une inhibition synaptique pour son bon fonctionnement ou 2) des neurones de type «pacemaker» qui ne sont pas dépendants de l'inhibition synaptique afin de produire le rythme (Richter and Spyer, 2001). Hedrick (2005) propose l'hypothèse que les neurones «pacemaker» seraient responsables de la génération du rythme tôt dans le développement de l'amphibien, mais qu'un transfert de la commande vers le réseau neuronal dépendant de l'inhibition synaptique (incluant une possible action résiduelle des neurones pacemaker) serait effectué suite à la métamorphose. Cependant, les études effectuées sur les troncs cérébraux de têtards ainsi que chez les adultes (superfusion de LCRA sans Cl⁻, blocage de l'inhibition synaptique par la bicuculline et strychnine) ont démontré que l'activité «pacemaker» des neurones serait présente autant chez le têtard que chez l'adulte, contredisant ainsi l'hypothèse d'un transfert de commande de la génération du rythme à travers le développement.

Une récente étude effectuée par le laboratoire de Hedrick proposerait une possible action des jonctions communicantes dans la génération des rythmes respiratoires chez le têtard. En effet, un blocage de ces jonctions viendrait inhiber l'activité respiratoire branchiale et pulmonaire du tronc cérébral de têtards pré-métamorphiques supportant l'hypothèse qu'un couplage électrique entre les neurones respiratoires serait important dans la génération du rythme respiratoire chez l'amphibien (Winmill and Hedrick, 2003).

3. Chémosensibilité de l'amphibien

Les chémorécepteurs sont des cellules spécialisées dans la détection de groupes de substances chimiques ou de molécules particulières. Ils interviennent non seulement dans la perception interne ou externe de molécules organiques relevant des sensibilités gustatives ou olfactives, mais répondent aussi aux modifications de la pression partielle de l'oxygène, à celles du dioxyde de carbone ainsi qu'au pH dans le sang et le liquide cébrospinal. Dans le cadre de la respiration, une activation des chémorécepteurs sensibles à l'oxygène ou au CO₂ engendre un chémoréflexe qui vient modifier le rythme respiratoire ainsi que la régulation afin de maintenir une PO₂ et une PCO₂ normale (guyenet, 2014). Ces récepteurs sont retrouvés au niveau périphérique et central (Anctil et al., 2006).

3.1 Chémoréflexe à l'O₂

Chez les vertébrés aquatiques, les chémorécepteurs périphériques à l'O₂ sont nécessaires pour initier les réponses comportementales (déplacements vers la surface de l'eau) et physiologiques (modification de la ventilation branchiale et pulmonaire, modification du rythme cardiaque) compensatoires à l'hypoxie afin de maintenir un échange convenable à travers les branchies et la peau. Cette caractéristique est présente chez la majeure partie des vertébrés à tous les stades du développement. Elle est cependant très bien démontrée avec les stades larvaires des amphibiens qui doivent garder un taux d'échange de gaz constant malgré l'augmentation de leur taille et de leur consommation d'O₂ due à la métamorphose tout en se développant dans un environnement peu riche en oxygène : l'eau (Jonz and Nurse, 2006).

3.1.1 Respiration aquatique

Les amphibiens, tout comme les poissons, possèdent des cellules neuroépithéliales sensibles à l'oxygène (NECS) qui sont situées dans l'épithélium des branchies. Les caractéristiques de ces cellules telles que la présence de la sérotonine (5-HT) ainsi que les vésicules synaptiques dans le cytoplasme rappellent celles des corps neuroépithéliaux pulmonaires sensibles à l'O₂ ainsi que les cellules de type I du corps carotidien des mammifères en développement (González et al., 1994; Cutz and

Jackson, 1999). Leur position sur les branchies nous porte à croire qu'elles sont en mesure de détecter la diminution du taux d'oxygène dans les milieux artériels et aquatiques leur permettant de répondre aux changements de la PO_2 par une hyperventilation ou un changement dans le rythme cardiaque et le tonus vasculaire (Burlison and Milsom, 2003). En effet, les cellules résident très près du courant de l'eau dans les branchies et leur organisation ressemble beaucoup à celle observée dans les ramifications vasculaires des branchies des têtards de *Xenopus* (Minnich et al., 2002). Malgré les évidences suggérant la présence de chémorécepteurs dans les branchies qui détectent la PO_2 de l'eau ainsi que des chémorécepteurs avec une orientation plus interne dans un site encore inconnu qui influencent indirectement la PO_2 , il est encore difficile d'affirmer qu'il existe une population de chémorécepteurs qui contrôle de façon différentielle la réponse ventilatoire et cardiaque à l'hypoxie au cours du développement (Jia and Burggren, 1997a,b; Jonz and Nurse, 2006).

Selon les études effectuées sur les amphibiens, plus précisément, avec *Lithobates catesbeianus*, ces chémorécepteurs retrouvés dans les branchies seraient bien fonctionnels et ce, dès le plus jeune stade, puisqu'une exposition des têtards à l'hypoxie a engendré une augmentation dans la fréquence de ventilation branchiale, dans la pression buccale ainsi que dans la circulation de l'eau à travers les branchies. De plus, l'exposition à une période d'hyperoxie induit les effets contraires à l'hypoxie (Jia and Burggren, 1997). En revanche, chez les stades plus âgés, une exposition à l'hypoxie diminue la fréquence de ventilation branchiale, mais vient augmenter la fréquence pulmonaire (Jia and Burggren, 1997; Burggren and Doyle, 1986). Cette modification de la réponse est due à l'importance que prennent les poumons en tant que principale surface d'échange gazeux au cours du développement (voir section 3.1.2). Malgré tout, un changement de la fréquence branchiale chez les stades avancés nous suggère que, même si à un certain point les branchies ne sont plus considérées comme le site principal d'échange gazeux, une partie des chémorécepteurs externes sont maintenus dans les branchies et restent fonctionnels malgré les changements physiologiques engendrés par la métamorphose. La perte de la chémosensibilité branchiale ne sera engendrée que par la réabsorption complète des branchies (Jia and Burggren, 1997; Burggren and Doyle, 1986).

3.1.2 Respiration aérienne

L'apparition de la chémosensibilité dans la respiration aérienne serait causée par une transition des récepteurs avec la métamorphose d'une position externe (branchies) vers une position plus centrale où ces derniers seraient moins sensibles à l'oxygène. Cette hypothèse est basée sur l'augmentation de la latence de la réponse à l'hypoxie qui serait en corrélation avec le développement du têtard (Jia and Burggren, 1997). Les chémorécepteurs redistribués à un niveau plus interne de l'animal sont regroupés en majeure partie dans une structure similaire au corps carotidien des mammifères, le labyrinthe carotidien (Kusakabe, 2002). Cette structure est composée de cellules de type 1 sensibles à l'oxygène qui occupent le même rôle que les chémorécepteurs externes en analysant le taux d'oxygène dans le sang. Le labyrinthe carotidien mature au cours du développement avant d'atteindre sa forme finale aux derniers stades de la métamorphose pour ensuite prendre le relais dans la détection des taux d'oxygène seulement lorsque la métamorphose est entièrement complétée (Kusakabe, 2002; Jonz and Nurse, 2006).

3.1.3 Chémiosensibilité centrale

La chémosensibilité à l'oxygène ne semblerait pas être seulement au niveau périphérique avec une transition des branchies vers le labyrinthe carotidien lors du développement de l'amphibien, elle serait aussi présente au niveau centrale et ce même chez des stades très jeunes de la grenouille (Winmill et al., 2005). Grâce à l'utilisation d'une préparation de tronc cérébral isolé soumise à une hypoxie, il a été possible de démontrer qu'une préparation provenant d'un têtard pré-métamorphique répondait aux bas taux d'oxygène par une augmentation de sa fréquence respiratoire fictive buccale et pulmonaire tandis que celle d'un adulte répondait par une augmentation de la fréquence buccale et une diminution de la fréquence pulmonaire (Fournier et al., 2007). Ces résultats démontrent non seulement la présence d'un chémoréflexe au niveau central peu importe le stade de l'amphibien, mais aussi une modification avec le développement de cette réponse. Puisque la préparation est complètement dépourvue de ses récepteurs périphériques, le chémoréflexe à l'oxygène serait contrôlé au niveau central. Nous en savons cependant encore peu sur

les mécanismes neuronaux dirigeant la réponse centrale à l'oxygène ainsi que l'interaction entre les chémorécepteurs centraux et périphériques (Fournier et al., 2007).

3.2 Chémoréflexe au CO₂

Chez les vertébrés utilisant la respiration aquatique, il a longtemps été supposé que ces derniers étaient dépourvus de tout chémorécepteur sensible au CO₂/pH. Cette hypothèse est fondée sur les caractéristiques de l'eau comparativement à l'air où le CO₂ est beaucoup plus soluble que l'oxygène dans l'eau. La ventilation importante pour acquérir de l'O₂ est donc amplement suffisante pour se débarrasser du CO₂ qui pourrait s'accumuler dans le sang, excluant ainsi tout besoin de détecter les taux de CO₂ dans le sang (Gilmour, 2001). L'oxygène exercerait donc le principal effet de contrôle sur la ventilation de l'animal aquatique et selon la théorie, la P_{CO2} ne deviendrait le stimulus principal de la respiration qu'une fois arrivé aux vertébrés terrestres lorsque la diminution de la ventilation provoquerait une importante rétention du CO₂.

3.2.1 Réponse développementale au CO₂/pH

Cette conception du contrôle respiratoire avait été transmise aux études de la respiration de l'amphibien au cours du développement. On proposait un transfert de la chémosensibilité au CO₂/pH des branchies vers les poumons suivant la migration des sites d'échanges gazeux à la métamorphose. Cette utilisation des poumons induisait une modification de l'importance du CO₂, qui deviendrait à ce moment le principal stimulateur de la commande respiratoire (Torgerson et al., 1997). Malgré cette conclusion attirante, il est possible de débattre sur sa véracité.

Tout d'abord, selon les études menées par l'équipe de Taylor, les branchies ne seraient pas les seules structures à contenir des chémorécepteurs au stade larvaire. Ces derniers ont démontré grâce à la préparation de tronc cérébral *in-vitro* que la fréquence respiratoire pulmonaire pouvait augmenter en réponse à l'hypercapnie à tous les stades développementaux malgré une réponse plus importante aux stades avancés, démontrant une présence de chémorécepteurs au niveau du système nerveux

central (Taylor et al. 2003 a,b). Il est aussi démontré par Torgerson que chez les larves d'amphibiens, la ventilation des branchies est régulée par les chémorécepteurs centraux de CO₂/pH. Ce dernier a effectué une stimulation hypercapnique centrale chez les têtards pré-métamorphiques qui a engendré une importante augmentation de la ventilation branchiale (Torgerson et al., 1997).

Dans le cadre de l'ontogénie de la respiration de l'amphibien, il est important de savoir si ces chémorécepteurs centraux se déplacent à travers les zones de la commande respiratoire, comme le feraient les générateurs de rythme centraux qui se déplacent d'une position caudale vers rostral dans le tronc cérébral avec la métamorphose. Torgerson a proposé que la chémosensibilité est apparue dans la zone caudale et rostrale du tronc cérébrale chez les têtard pré-métamorphiques avant de se concentrer dans la région plus rostrale suivant la métamorphose (Torgerson et al., 2001b). Des récentes études sur la préparation de tronc cérébral isolé ont cependant identifié deux zones sensibles au CO₂ à la hauteur des nerfs trijumeaux et vagues. Ces sites seraient constamment actifs à travers le développement sans se déplacer et il a été démontré que l'activation de ces deux zones simultanément engendrerait une réponse additive (Taylor et al., 2003a,b).

Ces conclusions nous indiquent que dans le cadre du développement larvaire, il y aurait un transfert de la commande respiratoire des branchies par les chémorécepteurs centraux vers la commande des poumons par ces mêmes récepteurs avant même que l'animal ait débuté sa métamorphose et ce jusqu'à ce qu'il atteigne la forme adulte (Milsom, 2010). À ce stade, les chémorécepteurs centraux génèrent 80% de la réponse respiratoire à l'hypercapnie, suggérant que suite à la métamorphose, ces derniers jouent un rôle dominant dans la régulation ventilatoire acide-base (Smatresk et a., 1991; Branco et al., 1992). Malgré tout, les mécanismes responsables de ce changement au cours du développement demeurent inconnus.

4. Régulation de la métamorphose

4.1 Plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est un processus par lequel l'animal modifie son comportement, sa morphologie, son histoire de vie ou sa physiologie en réponse aux changements de l'environnement (Via et al., 1995). Puisqu'il est reconnu que la plasticité est un phénomène qui se produit souvent (mais pas exclusivement) au cours du développement (Denver, 2009), il est intéressant dans le cadre de l'étude du développement de l'amphibien d'utiliser une des formes communes de plasticité phénotypique : la plasticité développementale. La grenouille représente un exemple parfait dans l'étude de cette forme de plasticité par son stade pré-métamorphique très sensible aux fluctuations de l'environnement influençant ainsi l'âge de la métamorphose.

Chez l'amphibien, plusieurs facteurs environnementaux peuvent venir influencer la métamorphose de la grenouille en formation. Ces facteurs peuvent être divisés en deux catégories : les facteurs abiotiques (la disponibilité de l'eau, la température et la photopériode) et les facteurs biotiques (compétition intra- et interspécifique et la prédation) (Denver, 2002). Chacun de ces facteurs peut influencer la qualité et la stabilité de l'habitat du têtard, qui se reflète en changement phénotypique chez l'animal (Denver, 2002). En effet, les espèces qui se reproduisent dans un environnement stable (lac et étang permanent ou semi-permanent) ont tendance à avoir un stade larvaire (têtard) plus long que les espèces d'un environnement plus précaire (étang éphémère) (Denver, 2002). Les larves d'amphibiens montrent donc une certaine plasticité dans leur période de métamorphose et peuvent capitaliser sur les conditions favorables à la croissance d'un environnement adéquat et riche afin de faire correspondre leur phénotype aux conditions environnementales en vigueur (Denver, 2002). Cette plasticité résulte en un juvénile/adulte qui est bien adapté aux conditions environnementales. Dans le cas contraire, un têtard vivant dans un milieu aride peut accélérer sa métamorphose. Pour ce faire, ce dernier doit cependant initier le processus avec une plus petite taille larvaire, diminuant ainsi ses chances de survie futures (Denver, 2009). Les têtards

élevés dans des conditions environnementales sous-optimales se métamorphosent à une plus petite taille et les jeunes sont donc plus susceptibles de présenter des taux de croissance plus lents, des capacités locomotrices inférieures, une plus grande sensibilité à la famine et un taux de mortalité plus élevé lorsqu'ils font face à des ressources limitées (Semlitsch et al., 1988; Berven, 1990; Goater, 1994; Scott, 1994; Beck and Congdon, 1999, 2000; Van Buskirk and Saxer, 2001; Alvarez and Nicieza, 2002; Altwegg and Reyer, 2003; Relyea and Hoverman, 2003).

4.2 Régulation endocrinienne centrale

La plasticité développementale des amphibiens est bien connue, mais les mécanismes à la base de ces changements phénotypiques en réponse à l'environnement restent mal compris. Le système neuroendocrinien sert d'interface entre le système nerveux central et la sécrétion d'hormones qui traduisent les signaux dérivés de l'environnement externe et interne en réponses physiologiques/développementales appropriées. Les structures supérieures de ce système ont chacune une influence spécifique sur les structures subalternes afin de modifier la réponse phénotypique aux conditions environnementales (Fig. 1.8). Les hormones produites sont connues pour influencer le niveau et le moment de l'expression des gènes affectant ainsi le développement de l'animal, modifiant les changements morphologiques et programmant les phénotypes comportementaux et physiologiques exprimés dans les stades de vie ultérieurs (Denver 2009). Les principales hormones impliquées dans la métamorphose proviennent de l'axe Hypothalamus - Hypophyse - Glandes surrénales et Thyroïdienne (HPA-HPT).

Selon les travaux de Etkin (1968), l'horloge qui détermine le moment de la métamorphose selon les signaux externes se trouve dans l'hypothalamus. Ce dernier sécrète un agent de libération de la corticotropine (Corticotropin Releasing Factor; CRF) qui aurait pour but de contrôler la sécrétion par l'hypophyse de l'hormone stimulant la glande thyroïdienne (Thyroid Stimulating Hormone; TSH) ainsi que l'hormone adénocorticotropique (adrenocorticotropic hormone; ACTH) (Denver, 1996). La TSH est nécessaire pour le développement de la glande thyroïdienne ainsi que sa synthèse de l'hormone thyroïdienne, importante molécule régulatrice du

développement (Voir section 4.3.1). Pour sa part, l'ACTH agit au niveau des cellules de la glande surrénale régulant ainsi la sécrétion des glucocorticoïdes. Comparativement au procédé de sécrétion de la TSH, nous en savons très peu sur le contrôle de la sécrétion d'ACTH par l'hypothalamus chez l'amphibien (Denver, 2013).

L'activité hypothalamique et sa liaison avec l'hypophyse serait donc nécessaire au développement de l'amphibien. En effet, Etkin a démontré qu'une relocalisation de l'hypophyse dans la queue du têtard coupant ainsi tout contact avec l'hypothalamus inhibe la métamorphose de l'amphibien (Etkin 1968). Ses travaux ont été supportés par Denver (1996) où un têtard ayant subi une destruction ou ablation chirurgicale de l'hypothalamus, brisant sa liaison avec l'hypophyse, n'était pas en mesure d'entrer en métamorphose. L'hypothalamus est non seulement nécessaire à la métamorphose, mais il est aussi activé en cas de changements de l'environnement. Une importante augmentation de CRF hypothalamique a été enregistrée chez des têtards qui ont dû accélérer leur métamorphose en réponse à la dessiccation de leur étang (Denver 1997b). Il est important de noter que dans le cas des amphibiens, la même hormone produite par l'hypothalamus (CRF) vient influencer le taux de sécrétion par l'hypophyse tant pour la TSH que pour l'ACTH. Le CRF étant une neurohormone du stress, nous pouvons considérer que cette dernière participe à une métamorphose induite par l'environnement (induite par le stress) (Laudet, 2011).

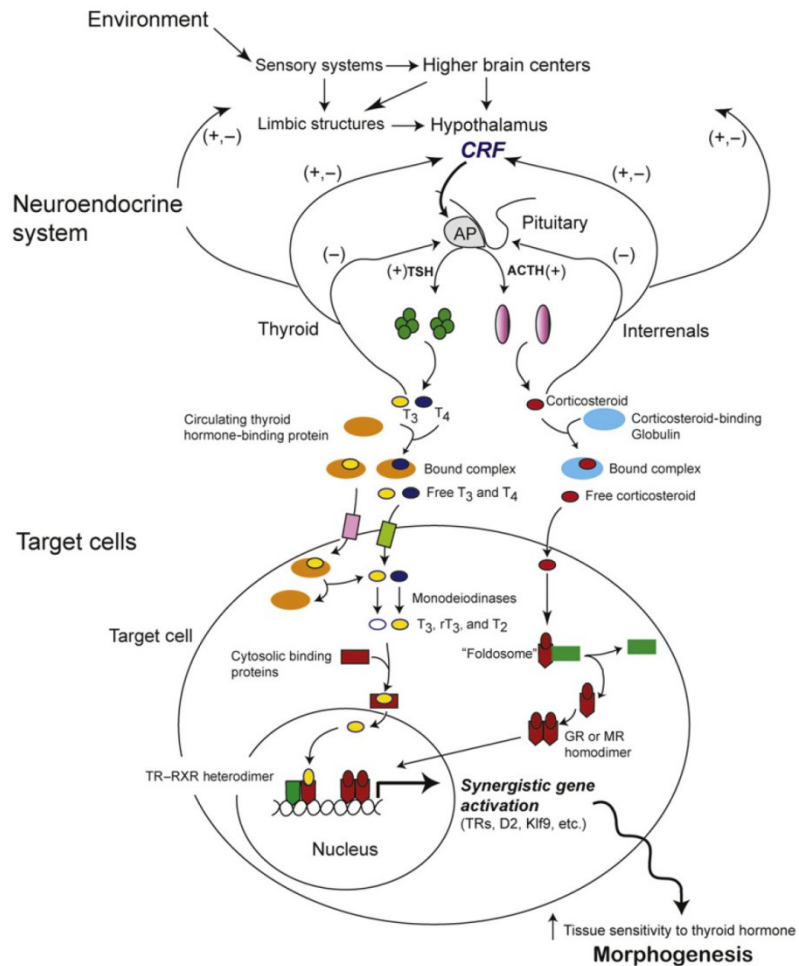


Figure 1.8 : Représentation schématique de l'axe HPA et HPT ainsi que les mécanismes d'intégration centrale et périphérique de l'axe du stress et de l'axe thyroïdien dans le contrôle de la métamorphose de l'amphibien. Tirée de Denver, 2009.

4.3 Modulation endocrinienne périphérique

4.3.1 Glande Thyroïdienne

Une caractéristique frappante de la métamorphose de l'amphibien est qu'une simple molécule sécrétée par la glande thyroïdienne (hormone thyroïdienne, TH) orchestre la multitude de changements morphologiques, biochimiques et moléculaires décidant ainsi du moment où la métamorphose débute et du rythme auquel elle progresse (Denver, 2013). La glande thyroïdienne se développe aux stades précoces de l'amphibien, mais elle n'est complétée qu'au début de la métamorphose (Dodd

and dodd, 1976; Regard et al., 1978). C'est aussi à ce moment que son activité débute pour atteindre son pic à la métamorphose avant de diminuer à la période adulte. La glande thyroïde sécrète deux types d'hormones: la thyroxine (T4) et la T3. L'hormone T4 est produite en plus grande quantité par la glande thyroïdienne, mais elle est en majorité transformée en T3 par l'action des enzymes monodésiodinases dans les organes périphériques suivant sa sécrétion (Holzer, 2013). La raison de cette conversion pourrait être que la T3 a une plus grande activité biologique comparativement à la T4 dû à sa grande affinité avec les récepteurs thyroïdiens (TR) (10 à 15 fois plus grande) (Oppenheimer et al. 1995). Rien n'exclue cependant que la T4 ne puisse jouer un rôle dans certains organes où les enzymes monodésiodinases ne sont pas actives. En relation avec la maturation de l'axe HPT, le pic de production des deux hormones se trouve au climax de la métamorphose tout comme l'expression des TR qui augmente à ce moment (Fig. 1.9). L'hormone thyroïdienne (T3) joue un rôle considérable dans le développement de l'amphibien. En effet, des têtards traités avec de l'hormone thyroïdienne exogène ont tous montré une métamorphose précoce. Par son action au niveau des récepteurs nucléaires ainsi que ses interactions au niveau transcriptionnel, elle active les programmes d'expression des gènes venant causer la prolifération, migration, différenciation et mort des cellules (Brown and Cai, 2007).

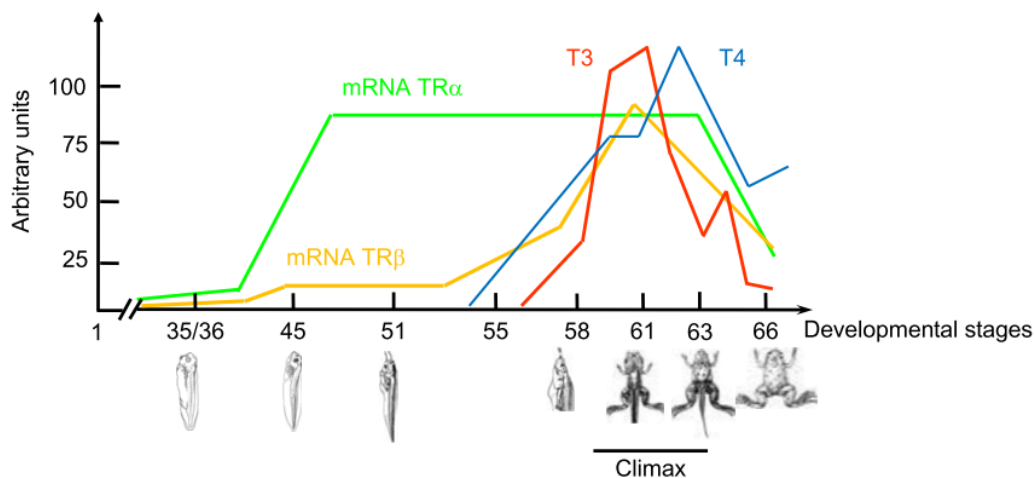


Figure 1.9 : Niveau des hormones thyroïdiennes et des récepteurs thyroïdiens au cours du développement de *Xenopus laevis*. Tirée de Holzer, 2013.

Un autre point intéressant à mentionner est que, malgré le manque de connaissances sur les mécanismes moléculaires derrière ce système, il est connu que la T3 est en mesure de contrôler sa propre production via des boucles de rétroaction négatives au niveau de l'hypothalamus et de l'hypophyse (Holzer, 2013). Ce mécanisme serait important pour limiter la sécrétion de TSH au cours de la maturation du système endocrinien signifiant que la coordination de la métamorphose aurait besoin d'une modération de l'expression de TSH par TH. Cependant, nous pouvons tout de même observer une production de CRF et de TSH au cours de la métamorphose, période où l'hormone thyroïdienne est en importante concentration dans le corps. La légère diminution de la sensibilité de l'hypophyse à la rétroaction négative par TH au climax de la métamorphose en combinaison avec la stimulation hypothalamique de la sécrétion de TSH serait vraisemblablement suffisante pour surmonter la rétroaction négative de TH à ce moment du développement (Denver 2013).

4.3.2 Glande surrénale

L'hormone thyroïdienne n'est pas la seule hormone jouant un rôle dans la métamorphose. Dès le stade pré-métamorphique du têtard, l'animal peut répondre à un stress environnemental par la production de corticostéroïdes, ce qui suggère qu'une maturation de son axe HPA se produit avant la métamorphose (Denver, 2013). Cette maturation contraste avec l'axe HPT qui lui mature au cours de la pro-métamorphose, moment où les membres sont apparus, mais sont encore en développement (Denver, 2013). Les principaux corticostéroïdes sécrétés par la glande surrénale de l'amphibien sont la corticostérone et l'aldostérone. Le cerveau est un important site ciblé par les corticostéroïdes qui se lient à un système de récepteurs constitué des récepteurs minéralocorticoïdes et des récepteurs glucocorticoïdes. Fait intéressant, le récepteur minéralocorticoïde a une affinité 10 fois plus importante pour la corticostérone que le récepteur glucocorticoïde. Le récepteur minéralocorticoïde est donc occupé en majeure partie avec des niveaux de base de corticostérone circulants. Le récepteur glucocorticoïde serait alors recruté lorsque les niveaux de corticostéroïdes augmentent tel qu'observé lors d'un stress (Reul and de Kloet, 1985).

Le rôle des corticostéroïdes dépend du stade de l'amphibien et du statut de la TH, pouvant ainsi accélérer ou ralentir le moment de la métamorphose (Hu et al., 2008; Glennemeier and Denver, 2002). Malgré tout, il a été démontré que les corticostéroïdes pouvaient accélérer la métamorphose induite par la TH grâce à l'interaction entre les hormones. Pour ce faire, les glucocorticoïdes ainsi que les minéralocorticoïdes augmentent l'expression des récepteurs TR et des gènes codant pour les monodésiodinases, la bioactivité de T3, ainsi que sa capacité de liaison à son récepteur nucléaire (Kikuyama et al., 1993). De plus, les corticostéroïdes augmentent l'action de la 5'-déiodinase, entraînant une génération plus importante de la molécule active T3 dans les tissus ciblés (Bonett et al., 2010). Des gènes autres que ceux ciblés directement par la TH sont aussi soupçonnés d'être régulés en synergie par TH et les corticostéroïdes, ce qui pourrait expliquer le mécanisme par lequel ces deux hormones coopèrent pour accélérer la métamorphose (Kulkarni et Buchholz, 2012).

4.4 Mode d'action génomiques des hormones

4.4.1 Homodimères

Il est reconnu depuis longtemps que les corticostéroïdes fonctionnent selon un mode d'action dit génomique qui engendre des modifications lentes du cerveau. Ces effets génomiques lents peuvent se produire sur une période qui débute entre 15 et 30 minutes après l'activation du récepteurs et qui peut s'étendre sur des heures et même des jours, selon une exposition continue ou non aux hormones (Morsink et al., 2006a,b). Une fois lié à son ligand, le récepteur minéralocorticoïde ou glucocorticoïde se déplace dans le noyau de la cellule afin de moduler la transcription via la méthode de transactivation et de transrépression (Fig. 1.10). Dans le cas de la transactivation, l'homodimère formé par la liaison ligand-récepteur se lie à des éléments de réponses aux glucocorticoïdes (GREs) sur l'ADN pour ensuite améliorer ou réprimer la transcription. Cette suppression de la transcription est rare, mais plus souvent retrouvée dans la boucle de rétroaction des corticostéroïdes sur la sécrétion de CRF et d'ACTH par l'hypothalamus et l'hypophyse respectivement (Beato and Sanchez-Pacheco, 1996). Pour sa part, la transrépression implique la liaison de l'homodimère ligand-récepteur à un facteur de transcription ayant pour but une

inhibition de certains mécanismes du corps (Guardiola-Diaz et al., 1996). Dans le cerveau, ce mode d'action est connu pour son rôle sur les fonctions neuronales tel que l'intégration des signaux afin de produire une réponse comportementale spécifique, la locomotion ou le comportement d'anxiété (Datson et al., 2008).

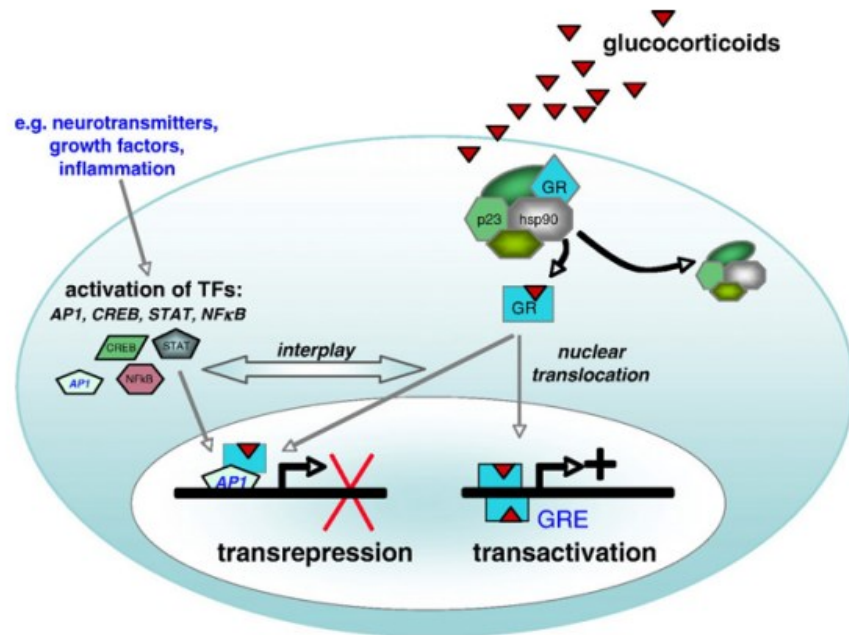


Figure 1.10 : Principal mode d'action génomique des corticostéroïdes. Méthode de transactivation et de transrépression. Tirée de Datson et al., 2008.

4.4.2 Hétérodimère

Outre la formation d'homodimères par les deux types de récepteurs dans la régulation de la transcription des tissus ciblés chez l'amphibien, il a été suggéré que la régulation de la réponse aux corticostéroïdes dans le cerveau soit aussi attribuée à un complexe d'hétérodimère formé par les deux récepteurs. Il a été démontré par Trapp (1994) que les récepteurs minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes peuvent former un complexe hétérodimérique avec les GRE. Puisqu'il est connu que ces deux récepteurs répondent aux niveaux physiologiques de glucocorticoïdes et qu'ils se lient aux mêmes éléments de réponse, une colocalisation de GR et MR dans la même structure du cerveau pourrait former ce complexe et engendrer une réponse différente

aux corticostéroïdes de celle de l'homodimère (Arriza et al. 1988; Datson et al., 2008).

4.5 Mode d'action non-génomique des hormones

Il a récemment été démontré que l'action des corticostéroïdes peut être effectuée par un effet non-génomique très rapide où nous observons une réponse quasi instantanée suite à l'activation du récepteur. Le fait que cet effet non-génomique ne peut être bloqué par des inhibiteurs de synthèse de protéine exclue la possibilité qu'il agit par la voie génomique des récepteurs (Datson et al., 2008). Ce mode d'action peu commun des corticostéroïdes a déjà été reporté dans les études d'activité locomotrice nouvellement induite ainsi que d'agressivité chez les rats mâles (Sandi et al., 1996; Mikics et al., 2004). Sachant que l'hormone thyroïdienne agit selon un effet génomique sur les tissus ciblés, il est nécessaire dans le cadre de l'étude d'identifier le mode d'action des corticostéroïdes qu'il soit génomique ou non.

4.6 Remodelage du système nerveux central par le système endocrinien

Il a été démontré que l'hormone thyroïdienne en synergie avec les corticostéroïdes régule la métamorphose de l'amphibien via un mode d'action génomique afin d'influencer la croissance, la différenciation ainsi que la mort cellulaire. Ces hormones seraient aussi importantes dans le remodelage du système nerveux central au cours du développement, affectant les régions nécessaires à la transition du stade larvaire vers un mode de vie adulte (Denver, 1998). Au cours de cette modulation, certaines structures présentes chez le têtard sont éliminées. Par exemple, les neurones «Mauthner» situés de chaque côté du bulbe rachidien ainsi que les motoneurones sensoriels contrôlant les muscles de la queue disparaissent lors de la métamorphose (Kollros, 1981). Il est aussi possible d'observer le développement de certaines structures avec le passage vers le stade adulte parmi lesquelles nous retrouvons le nucléus mésencéphalique du nerf trijumeaux (nerf V), le cervelet et les segments connectant la moelle épinière aux membres antérieurs et postérieurs (Kollros and McMurray, 1956; Gona et al., 1988; Beaudoin, 1956).

5. Objectif de la recherche

Malgré les connaissances multiples sur la modulation du système nerveux par l'hormone thyroïdienne et les corticostéroïdes, nous en savons très peu sur l'action de ces hormones dans le développement des centres de contrôle de la respiration au cours de la métamorphose. Les études sur la préparation du tronc cérébral *in-vitro* de l'amphibien est donc un premier pas dans la compréhension des mécanismes régissant la modification des structures responsables de la transition d'une respiration aquatique vers une respiration terrestre. Compte tenu du rôle des hormones de l'axe HPA et HPT dans la métamorphose des amphibiens, il est plausible que la restructuration du système nerveux central par les hormones au cours de la métamorphose affecte également le système de contrôle de la respiration et contribue ainsi à l'émergence de la respiration aérienne chez les grenouilles adultes.

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord testé l'hypothèse selon laquelle **une application des hormones T3, aldostérone et corticostérone sur la préparation de tronc cérébral isolé de *Lithobates catesbeianus* influence le développement de la commande respiratoire**. Considérant l'action à long terme (génomique) de ces hormones, leur application a été effectuée sur une période de 1h (exposition aigue) ainsi que sur une période de 24h (considérée ici comme une exposition chronique). Puisque l'influence par le CO₂/pH dans la commande respiratoire pourrait contribuer à l'évolution de l'activité respiratoire associée à l'exposition aux hormones, la réponse au CO₂/pH a été évaluée avant et après le protocole de traitement (Chap.II).

6. Méthodes générales

6.1 La préparation du tronc cérébrale *in vitro*

La technique d'isolation du tronc cérébral a été développée en 1931 (Adrian and Buytendijk, 1931) à partir d'un cerveau de poisson rouge et consistait à isoler le tronc cérébral de l'animal pour le placer ensuite sur une lame de verre et l'humidifier par un liquide de «Ringer» (solution composée de chlorure de sodium, de potassium et de calcium), avant d'apposer des électrodes sur la surface du tissu. Heureusement,

cette technique a été perfectionnée avec les années. Une fois le cerveau extrait de la boîte crânienne, il est déposé dans une chambre d'enregistrement où le tissu baigne dans une solution oxygénée dont la composition ionique et nutritive s'apparente au liquide céphalorachidien (LCRa). Nous pouvons ensuite mesurer l'activité respiratoire par des enregistrements intra- ou extracellulaires, selon l'étude désirée (Fig. 1.11) (Belzile et al., 2004). Dans le cadre de la recherche en neurobiologie respiratoire, le tronc cérébral des mammifères a depuis toujours été la référence afin de comprendre les mécanismes de contrôle respiratoire. Il est bien sûr logique de croire que le mammifère est le meilleur modèle expérimental afin de comprendre le système respiratoire de l'humain. Un second groupe de vertébré a cependant récemment attiré l'attention des chercheurs dans le domaine de la neurobiologie respiratoire tant par ses avantages techniques que par la ressemblance avec les mammifères de ses principes fondamentaux régissant le fonctionnement et le développement du système de contrôle de la respiration. Ce modèle est l'amphibien et bon nombre de scientifiques ont fait progresser nos connaissances dans le domaine de la neurobiologie de la respiration grâce à l'utilisation du tronc cérébral de cet animal.

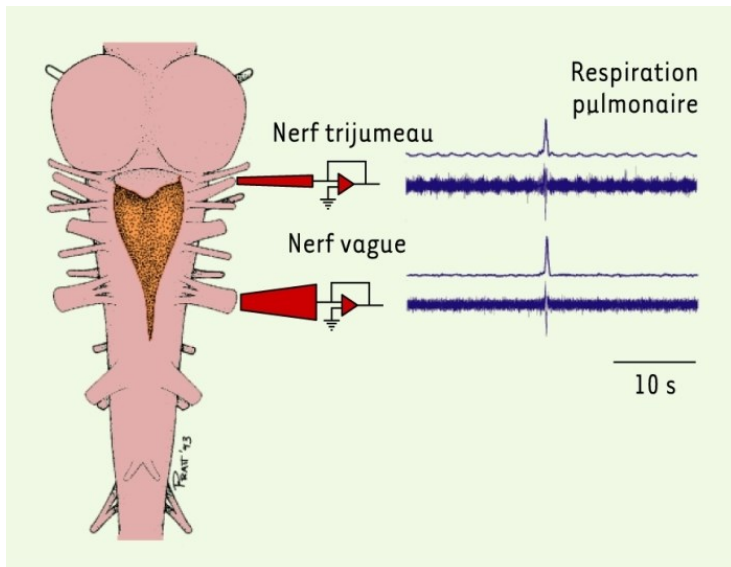


Figure 1.11 : Préparation de tronc cérébral isolé de *Lithobates catesbeianus*. Enregistrement électrophysiologique de l'activité respiratoire à partir des nerf trijumeaux et vague. Tirée de Belzile et al., 2004.

6.2 Avantages du tronc cérébral isolé de l'amphibien

Un important problème dans l'utilisation du tronc cérébral de mammifère est que ce dernier n'est pas résistant à l'hypoxie. Puisqu'il est détaché du système vasculaire, les échanges gazeux ne se font que par diffusion à travers les membranes. Cette diffusion étant très lente, les neurones respiratoires finiront par être exposés à une hypoxie ou acidose tissulaire, qui vont toutes deux perturber le fonctionnement des neurones. Il est donc impossible d'utiliser ici une préparation provenant d'un mammifère adulte puisqu'il ne survit pas assez longtemps dans ces conditions. Afin de contrer cette problématique, la préparation doit provenir de nouveau-nés où la tolérance des circuits nerveux à l'hypoxie est plus importante et doit être maintenue à une température entre 25 et 28°C (Belzile et al., 2004). Par sa structure simple et sa robustesse, le tronc cérébral de l'amphibien sera ainsi un bien meilleur choix pour l'étude du développement du système de contrôle respiratoire lors de la transition du milieu aquatique vers le milieu terrestre.

6.2.1 Une préparation robuste

Le tronc cérébrale de l'amphibien présente une grande tolérance à l'hypoxie et à l'acidose peu importe le stade développementale. Le tronc cérébral sera viable peu importe le stade (pré-métamorphique ou adulte), ce qui résout la contrainte apposée par l'utilisation du mammifère dans l'étude du développement respiratoire. La préparation de l'amphibien est aussi viable sur une durée bien plus importante que celle du mammifère. Tandis que le tronc cérébral isolé du mammifère génère un rythme constant sur une période d'environ 7h (Suzue, 1984), celui de l'amphibien peut produire un rythme respiratoire plus de 24h suivant la séparation du tronc cérébral avec le reste du corps de l'animal (Voir Chapitre II). De plus, une température supérieure à la température du corps n'a pas besoin d'être atteinte puisque 20°C est la température physiologique de la grenouille (Belzile et al., 2004). Une température trop élevée peut cependant détériorer la préparation à long terme (Voir chapitre II). Finalement, selon les résultats obtenus à ce jour, il a été démontré que, malgré les différences propres à la mécanique respiratoire, les structures et les principes fondamentaux du contrôle de la respiration ont été conservés au cours de

l'évolution, nous permettant de comparer les données recueillies à celles de mammifères. Nous avons par exemple la conservation des oscillateurs centraux qui régissent le rythme respiratoire en synergie ainsi que les épisodes respiratoires observés chez la grenouille adulte qui sont aussi présents chez les mammifères en hibernation ou chez certains nouveau-nés prématurés (Belzile et al., 2004; Milsom et al., 1997).

6.2.2 Similarité *in-vivo* / *in-vitro*

Malgré l'absence de l'information des récepteurs périphériques, le profil respiratoire provenant du tronc cérébrale de l'amphibien *in-vitro* est similaire à celui enregistré chez en animal entier. La préparation peut donc générer son propre rythme respiratoire et elle est aussi sensible aux changements de gaz du milieu. De plus, la respiration épisodique observée chez l'animal entier est aussi retrouvée au niveau des préparations de troncs cérébraux *in-vitro* (Fig. 1.12). Cette dernière ne serait donc pas un artéfact expérimental et la production d'épisodes ne serait pas sous l'influence des structures supérieures du cerveau et ne nécessite pas les informations sensorielles (Hedrick, 2005). Ces caractéristiques (fréquences respiratoires, réponse au CO₂, présence d'épisodes respiratoires) sont présentées dans le chapitre II de ce manuscrit.

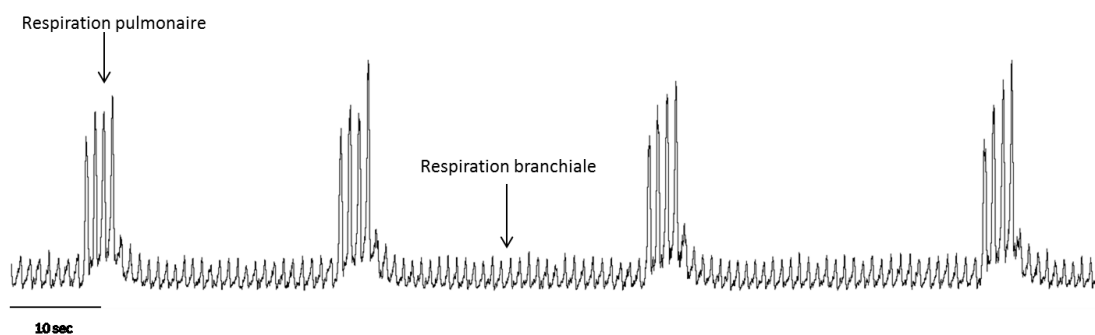


Figure 1.12 : Enregistrement électrophysiologique de la respiration épisodique chez *Lithobates catesbeianus* au stade adulte. Enregistrement de l'activité motrice du nerf trijumeau.

Chapitre II

Aldosterone, corticosterone, and thyroid hormone and their influence on respiratory control development in *Lithobates catesbeianus*; an *in vitro* study

Jean-Philippe Rousseau, Aida Bairam, and Richard Kinkead

Département de Pédiatrie, Université Laval, Centre de Recherche du CHU de Québec, Hôpital St-François d'Assise, Québec, QC, Canada G1L 3L5

Résumé

L'émergence de la respiration aérienne au cours du développement de *Lithobates catesbeianus* demande d'importants changements dans le circuit cérébral qui génère et régule le rythme respiratoire. Malgré les connaissances déjà acquises sur le sujet, les mécanismes responsables de l'initiation et de la régulation de cette transformation restent mal compris. La métamorphose étant influencée par différentes hormones métamorphiques telles que l'aldostérone, la corticostérone et l'hormone thyroïdienne (T3), nous avons testé l'hypothèse proposant qu'exposer le cerveau à ces hormones augmenterait le rythme respiratoire aérien fictif chez les têtards pré-métamorphiques de *Lithobates catesbeianus*. Les troncs cérébraux ont été isolés puis placés pour traitements soit dans une chambre d'enregistrement (aigue; 1h exposition + 1h récupération) ou dans une bouteille fermée hermétiquement (chronique; 24 d'exposition). Les préparations ont été exposées à un liquide céphalorachidien artificiel (LCRa; traitement contrôle) ou une des hormones suivante : aldostérone (100nM), corticostérone (100nM), hormone T3 (100nM) ou une combinaison de deux des composantes précédentes. Alors que nous avons observé de faibles effets sur la commande motrice suite à l'exposition aigue, l'exposition chronique avec chaque hormone a fait augmenter significativement la respiration aérienne. La ventilation fictive des préparations exposées aux hormones présentait des similarités avec celles provenant d'adultes. Nous concluons que, grâce à leurs effets à long terme, les hormones régulant la métamorphose peuvent déclencher la maturation des circuits neuronaux qui génèrent et régulent la respiration de cette espèce.

Mots-clés: Amphibien, Grenouille taureau; Tronc cérébral; Contrôle respiratoire; Développement, axe HPA; Chémorécepteur CO₂/pH.

Abstract

The emergence of air breathing during *Lithobates catesbeianus* development requires significant changes to the brainstem circuits that generate and regulate breathing; however, the mechanisms responsible for initiating this transformation remain largely unknown. Because amphibian metamorphosis is regulated by hormones such as aldosterone, corticosterone, and thyroid hormone (T3), we tested the hypothesis that exposing the brainstem to these hormones augments the fictive air breathing frequency in pre-metamorphic tadpoles. Brainstems were isolated and were placed either in the recording chamber (acute; 1h + 1h recovery) or in a bottle (chronic exposure; 24h) for treatment. Brainstems were exposed to artificial cerebrospinal fluid (aCSF; sham treatment) or one of the following hormones: aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM), or T3 (100 nM). While acute exposure had limited effects on respiratory motor output, chronic incubation with any hormone significantly increased fictive air breathing; the burst frequencies observed following treatment were similar to those observed in adult bullfrogs. We conclude that through their long term effects, hormones regulating metamorphosis can initiate the maturation of the neural circuits that generate and regulate breathing in this species

Keywords: Amphibian, Bullfrog; Brain stem; Control of Breathing; Development, HPA axis; CO₂/pH Chemoreceptor.

1. Introduction

During their life cycle, aquatic bullfrog tadpoles undergo substantial anatomical and physiological changes that ultimately enable them to exploit the terrestrial environment. The progressive use of air as an “O₂-rich” gas exchange medium offers several advantages and consequently, transformations of the respiratory system are an important part of this developmental process. In tadpoles, air breaths can be observed at an early stage (Taylor Kollros, TK stage IV) even at a time when the lungs are immature and do not contribute to gas exchange. Prior to metamorphosis, the gills and skin are the primary site for gas exchange (Burggren and West, 1982; Burggren and Doyle, 1986). As the gills begin to regress, however, the lungs emerge as the most important structure for gas exchange (Torgerson et al., 1998; Burggren and Infantino, 1994). To be fully functional, these anatomical transformations of the respiratory system require changes in the neural control network producing and regulating the motor command. Early investigations of respiratory reflexes have revealed the complex interactions between the mechanisms controlling gill and lung breathing during tadpole development (Burggren and West, 1982) and the subsequent use of reduced brainstem preparations have allowed substantial progress in our understanding of respiratory control development in bullfrogs (Torgerson et al., 1998, 2001; Kinkead, 2009). To this day, however, the mechanisms initiating this developmental process remain poorly understood.

In developing tadpoles, the most significant morphological transformations take place during metamorphosis, a tightly orchestrated process which is the result of the interplay between the neuroendocrine system and environmental signals (Denver, 2013). Thyroid hormone (TH) is a primary morphogen as it regulates metamorphosis by influencing the expression of genes that lead to cell proliferation, death, differentiation or migration (Brown and Cai, 2007). This hormone is necessary for tadpole metamorphosis since the removal of the thyroid gland prevents this process (Allen, 1925). Corticosteroids (corticosterone and aldosterone) produced by the interrenal glands influence the rate of metamorphosis by controlling TH production and action on target tissues (Denver, 2009). While many hormones (including

steroids) can exert rapid, non-genomic effects on neurons *via* activation of G protein-coupled membrane receptors, corticosterone and aldosterone are better known for their so called “genomic actions” where the receptor, once bound to its ligand, translocate to the cell nucleus where it can modulate gene transcription (Datson et al., 2008). Corticosterone and aldosterone exert these effects *via* a binary receptor system consisting of glucocorticoid receptors (GR) and mineralocorticoid receptors (MR) respectively (Datson et al., 2008). Furthermore, these pharmacologically distinct receptors can interact when binding to glucocorticoid response element at the gene level (Arriza et al., 1988; Trapp et al., 1994).

Given the role of these hormones in amphibian metamorphosis and the knowledge that in rat, the hypothalamo-pituitary-adrenal axis has significant anatomical and functional interactions with several brainstem areas that regulate breathing (Behan and Kinkead, 2011), it is plausible that this restructuring of the CNS by hormones also affects the respiratory control system and thus contribute to the emergence of air breathing in adult frogs. We recently addressed this hypothesis by exposing isolated brainstems from *Xenopus laevis* to corticosterone (100 nM; 1h; Fournier et al, 2012) and data show that following 1h of exposure to the hormone, the fictive air breathing frequency measured in tadpoles brainstems was increased and well within the range observed in adult frogs *in vivo* (Boutilier, 1984). Moreover, this effect of corticosterone is stage-dependent because the same treatment applied to brainstems from adult frogs had no effect (Fournier et al, 2012). These highly promising results being consistent with our main hypothesis, the present study aimed to further investigate the effects of hormones regulating amphibian metamorphosis on respiratory control development. To do so, we chose to use *Lithobates catesbeianus* since this species exploits the terrestrial habitat more readily than *Xenopus*. Owing to its predominant role in metamorphosis, our interest was centered on the action of T3, the biologically active compound; we also investigated the effects of corticosterone and aldosterone as these hormones also play an important role in the regulation of metamorphosis. The effects of hormone application was tested individually or combined since corticosteroids act in synergy with TH to promote extensive remodeling of the CNS (Denver, 1998). Because acute (1h) exposure likely limits the

possibility of observing changes associated with the long term (genomic) effects of hormones, we first developed an experimental approach allowing us to test the effects of chronic (24h) hormone exposure on the respiratory motor output produced by the brainstem.

CO₂/pH level in tissues is the predominant respiratory stimulus in air breathing organisms. With metamorphosis, the progressive use of the lungs for gas exchange results in CO₂ retention (Just et al., 1973) and consequently, tadpole development has been linked with the emergence of CO₂/pH chemosensitivity as an important source of respiratory drive (Torgerson et al., 1997b; Milsom, 2010). Though attractive, this hypothesis is debatable. The relative contribution of central *versus* peripheral chemoreceptors to CO₂/pH to this drive is uncertain given that isolated brainstems increase lung burst frequency in response to hypercapnia at all developmental stages (Taylor et al. 2003a, b). Regardless, because changes in CO₂/pH respiratory drive could contribute to the changes in neuroventilatory activity associated with hormone exposure, CO₂/pH responsiveness was assessed before and after the treatment protocol. In addition to obtaining valuable insight into the effects of hormones on this chemoreflex, testing central chemosensitivity made it possible to assess the overall “health” of the brainstem preparation 24h after being removed from the animal.

2. Methods

2.1 Animals

Experiments were performed on 130 brainstem preparations from bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles and 18 brainstems from adult bullfrogs. All experiments complied with the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The institutional animal care committee approved the specific protocols used in this study. Animals were obtained from a commercial supplier (Island Bullfrog, Nanaimo, BC) and were housed in aquaria supplied in flowing, filtered and dechlorinated Québec city water maintained between 19° and 22°C (photoperiod: 12h light/dark). Tadpoles were fed frozen spinach, goldfish food (Goldy Royal, Sera), and algae present on the surface of the aquaria whereas adults received live crickets (CG Reptile Inc., Saint-Apollinaire, QC, Canada).

2.2 *In vitro* brainstem preparations

Surgical procedure and recording techniques have been described previously (Fournier et al., 2012). Briefly, animals were anesthetized by immersion in ice cold tricaine methane sulfonate (1g/L) buffered to pH 7.0 with NaHCO₃ (Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ontario). Once unresponsive to tail pinch, the developmental stage was determined based on the morphological criteria from Taylor and Kroll (1946). Tadpoles were between TK stages V and X; at that stage, animals have no developed limbs. Tadpoles were then decerebrated by a transection just rostral to the eyes. The cranium was opened to expose the brainstem and rostral spinal cord and to allow dissection of the cranial nerves. During dissection, the brainstem was superfused with oxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) kept at cold temperature (0-5°C) to avoid a sudden change in temperature and reduce axonal conductance throughout the dissection procedure (Fournier et al., 2007). The composition of the tadpole aCSF consisted of (in mM): NaCl (104); KCl (4.0); MgCl₂ (1.4); NaHCO₃ (25.0); CaCl₂ (2.4); D-glucose (10.0). Adult aCSF was composed of (in mM): NaCl (75.0); KCl (4.5); MgCl₂ (1.0); NaHCO₃ (40.0); CaCl₂ (2.5); NaH₂PO₄ (1.0); d-glucose (7.5). Note that the higher HCO₃⁻ used for adults is based on values reported for whole

blood (Toews and Stiffler, 1990) and the aCSF composition used in other laboratories working on this species (Winmill et al., 2005; Reid et al, 2000). The superfusate was equilibrated with a 98% O₂ / 2% CO₂ gas mixture and had a pH 7.90 ± 0.10 which corresponds to normal blood pH in this species (Just et al, 1973; Kinkead and Milsom, 1994). The brainstem was finally transected between the optic tectum and the forebrain and then caudal to the hypoglossal nerve before being transferred to the recording chamber coated with Syglard (Dow Corning; Midland, MI, USA) where it was immobilized with insect pins ventral side up. The arachnoid and pia membranes were then carefully removed.

2.3 Electrophysiological recordings

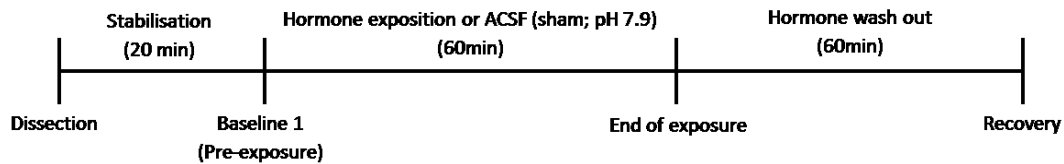
Using suction electrodes, bursts of respiratory-related motor activity were recorded simultaneously from the rootlets of the trigeminal (V) or facial (VII) nerves and the vagal (X) nerve. Vagal nerve activity was used as a sensitive marker of fictive lung activity to distinguish between lung- and buccal-related signals (Kogo et al., 1994; Kogo and Remmers, 1994). The pipettes were constructed from borosilicate glass (1.5 mm) pulled to a fine tip with a vertical microelectrode puller (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA). The tip was broken and beveled to achieve an appropriate tip diameter. Neural activity signal recorded from the suction electrodes were amplified (10k) and filtered (low cut-off 10Hz, high cut-off 1kHz) using a differential AC amplifier (model 1700; A-M Systems, Everett, WA, USA). Signals were then full-wave rectified and integrated (time constant 100ms) using a moving average (model MA-821; CWE, Ardmore, PA, USA). The raw and integrated nerve signals were digitized for recording with a data acquisition system (model DI-720; Dataq Instrument, Akron, OH, USA). The sampling rate of the analog to digital conversion for the raw signal was 1250 Hz.

2.4 Experimental protocols

Once the recording electrodes were in place, the brainstem preparation was superfused with aCSF at room temperature (19 - 21°C) delivered at 7 ml min⁻¹. The aCSF was not recycled. The preparation was allowed to return progressively to ambient temperature and recover from the isolation procedure until stable rhythmic

neural activity was recorded from both nerves (~20 min). Figure 2.1 illustrates the time course of the experimental protocols used in the two series of experiments.

A) Series I: Acute exposure



B) Series II: Chronic exposure

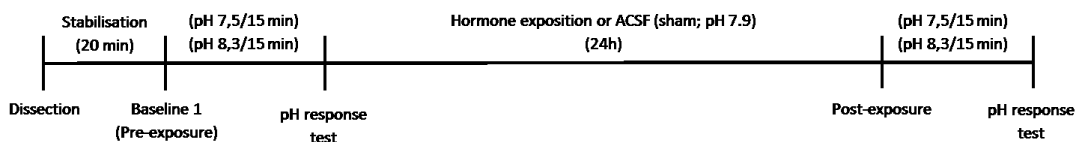


Figure 2.1: Schematic representation of the time course of the experimental protocols used to assess the effects of A) acute (1h) and B) chronic (24h) application of mineralocorticoid, glucocorticoid and thyroid hormone on fictive gill and lung breathing frequencies.

2.4.1 Series I: effects of acute (1h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency

Once recovery from dissection was complete, the neural correlates of gill and lung ventilation were recorded under “resting” conditions for 10 min (baseline 1; pre-exposure; see figure 2.1A). Corticosterone (100 nM), aldosterone (100 nM), T3 (100 nM) or T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM) was applied to the brainstem preparation for 60 min before a second recording (end of exposure) was performed. A final recording was performed at the end of the 60 min wash out period (recovery). In this series, the aCSF containing the hormones was delivered continuously (non-static) at the same flow rate as the control aCSF. The hormone concentrations were chosen because they correspond to plasma levels measured in intact animals following stress exposure (Licht et al., 1983; Dupont et al., 1976; Krain and Denver, 2004). Aldosterone and corticosterone were first dissolved in DMSO and T3 was dissolved in NaOH and addition of the stock hormones solutions into the main reservoir did not

affect the pH of the aCSF. Considering the long duration of the entire protocol (over 2h), time-control experiments were performed to ensure that changes in fictive breathing were due to experimental treatment rather than to non-specific, time-dependent changes in motor output. Since acute exposure had very limited effects on respiratory motor output (see results) the effects of T3 + corticosterone was not tested. Because the action of these hormones on the brainstem likely involves a slower mechanism for which changes in genes expression is necessary, the effect of a longer exposure to corticosterone, aldosterone or T3 was evaluated in another series of experiments.

2.4.2 Series II: effects of chronic (24h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency

As in the previous series, baseline gill and lung burst frequencies were recorded for 10 min (baseline 1; pre-exposure) after the dissection (see figure 2.1B). The brainstem was then transferred from the recording chamber to a 250 ml glass bottle containing aCSF equilibrated with 98% O₂ + 2% CO₂ gas mixture and supplemented with aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM), T3 (100 nM), T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM) or T3 + corticosterone (100 nM +100 nM) and kept at room temperature (19° - 20°C) for 24h. Bottles were capped and constantly shaken gently to ensure a renewal of aCSF around the brainstem. After 24h, the brainstem was transferred back into the recording chamber and a second baseline (post-exposure) recording was performed with sham aCSF. Note that because replacing the electrode onto the nerve rootlet likely results in changes in conductivity affecting the quality and intensity of the nerve signal, it was not possible to reliably compare burst amplitude before and after hormone exposure. Despite this limitation, this approach was chosen because with the flow through system, nerve rootlets occasionally slipped out of their suction electrodes during prolonged incubation and preliminary experiments showed that placing the brainstem in a hermetic recipient was the most convenient way to ensure constant brainstem conditions over a prolonged period of time (see Table 2.1). Once again, time-controls experiments were performed to assess the effect of incubation alone (i.e. without hormone treatment).

To evaluate incubation conditions over the course of the experiments, pH, PO₂, PCO₂ of the aCSF was measured before and after the chronic exposure protocol using a blood gas analyser (ABL5, Radiometer model ABL-5, Radiometer, Copenhagen, Denmark). aCSF samples were obtained randomly between the different experimental groups (aCSF alone *versus* hormone treatment).

2.4.3 CO₂/pH chemosensitivity test

In order to measure the effects of hormone exposure on central chemosensitivity, the aCSF circulating in the recording chamber was changed to a pH of 7.5 and 8.3 by manipulating the levels of O₂ and CO₂ in the gas mixture bubbling the aCSF. Exposure to each level of CO₂/pH lasted 15 minutes. This procedure was performed following baseline measurement and after hormone exposure (Fig. 2.1B).

2.4.4 Adult frogs

In order to compare the effects observed in tadpoles after hormone exposure with the motor output produced by a mature system, the same brainstem extraction procedure and electrophysiological recording were performed on brainstems from adult frogs (N = 18). These animals have metamorphosed in the animal care facility and were less than one year and ranged in size between 5 and 8 cm (tail to snout). The neural correlates of lung and gill (buccal) ventilation were recorded under baseline conditions; this was followed by a chemosensitivity test identical to the one described for tadpoles. Based on previous results showing the lack of hormone responsiveness in adult frog (Fournier et al., 2012), the effects of acute exposure were not assessed in these preparations. Preliminary experiments aiming to assess the effects of chronic hormone exposure on adult preparations showed that these brainstems could not reliably survive to the 24 incubation procedure at room temperature. While performing the incubations at a lower temperature may have increased survival rate, this possibility was not pursued in adult preparations.

2.5 Data analysis

Frequency values for respiratory burst activity were obtained by analysing the last 10 min of recording for each condition. *In vitro* tadpoles typically produce two

patterns of respiratory-related neural activity: (1) high frequency, low amplitude, and (2) low frequency, high amplitude, reflecting fictive gill and lung ventilation, respectively (Liao et al., 1996; Torgerson et al., 1998). Consequently, analysing 3 to 4 segments of stable and uninterrupted recording (60 s each) was sufficient to obtain a representative gill burst frequency. Conversely, lung burst frequency values were obtained by analysing the entire segment (10 min) and values were averaged for a 1 min period. Note that the amplitude measurements obtained in series I showed no significant effect of time or treatment and were not reported for conciseness and consistency between experimental series. The presence of bursting episodes was determined according to the criteria proposed by Kinkead and Milsom (1994). Briefly, bursting was considered to occur in episodes when large amplitude bursts occurred in succession and that the time between each event did not exceed the length of two individual bursts.

Statistical analyses were performed using an analysis of variance (ANOVA; Statview version 5.0, SAS Institute, Cary, NC, USA). Two factors were considered: time (baseline *versus* recovery and post-exposure/end of exposure) and hormone treatment (with or without exposure); these analyses did not discriminate whether hormone application was performed individually or in combination. A distinct analysis was performed to assess the effects of hormone exposure on the gill and lung burst frequency response to CO₂/pH changes. Two factors were considered: time and pH (pH 7.5, pH 7.9, pH 8.3). Because chemosensitivity was lost following chronic incubation under sham conditions, the effects of hormones were not tested. Whenever the effects of a factor (or interaction between factors) were significant ($p < 0.05$), the ANOVA was followed by Fisher's protected least significant difference test. ANOVA results are reported in the figures legend; results from *post hoc* tests are displayed as symbols in the figures.

3. Results

3.1 Effects of acute (1h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency

The facial (VII) and vagal (X) neurograms presented in Figure 2.2 show that, by comparison with baseline (panel A) acute (1h) exposure to hormones had a limited effect on the neural correlates of gill and lung ventilation. Following recovery (panel C), aldosterone treatment was the only condition in which a small but statistically significant increase in lung burst frequency was detected (Figs. 2.2D and 2.3A). Aldosterone alone did not influence gill burst frequency (Fig. 2.2E) but when combined with T3, a significant decrease in gill burst frequency was observed by the end of the protocol compared to time-control (Fig. 2.3B).

3.2 Effect of chronic (24h) incubation under control condition (no hormone) on neurorespiratory activity

Table 1 reports values of pH, PO₂, and PCO₂ of the aCSF contained in the bottles before and after the 24h incubation protocol. Samples were taken randomly from each treatment. Since no differences were observed between sham (aCSF) and hormone treatment, data were combined (Table 2.1). PO₂ was the only variable that changed during the 24h protocol. Over that period, PO₂ decreased by 11% (table 1). Note, however, that the low PCO₂ values were near the inferior limit (5 mmHg) of the effective range for the PCO₂ electrode.

Table 2.1: Measurement of pH, PO₂ and PCO₂ of aCSF in the bottle containing the tadpole brainstem before and after incubation. Number of bottles: N=9. ANOVA: Time effect (PO₂): P<0.0001. Data are reported as means ± s.e.m. *Significantly different from the corresponding baseline value at P<0.05.

	Before the 24h period	After the 24h period
Mean PO₂ (mmHg)	690 ± 36	611 ± 35 *
Mean PCO₂ (mmHg)	13 ± 1	12 ± 1
Mean pH	7.78 ± 0.04	7.78 ± 0.07

The bursting patterns recorded before and after sham incubation (aCSF alone) were similar (Fig. 2.5A and B). The mean lung and gill burst frequencies obtained before and after incubation did not differ either (Fig. 2.4A and B). However, brainstems maintained in aCSF for 24h lost central chemosensitivity since changes in CO₂/pH no longer affected lung burst frequency (Fig. 2.6A and D).

3.3 Effects of chronic (24h) exposure to hormones on fictive gill and lung breathing frequency

One day exposure to hormones increased lung burst frequency in all groups (except sham). This effect was observed whether the hormones were applied individually or in combination (Figs. 2.4A and 2.5D, respectively); the greatest response was observed in preparations exposed to T3 and aldosterone simultaneously (Fig. 2.5D). The neurogram presented in Fig. 2.5C shows that this increase in lung burst frequency was associated with the appearance of bursting episodes in which the amplitude occasionally increased with each successive breath (crescendo). While assessing the occurrence of crescendos in bursting activity was difficult (e.g. which nerve to measure, difference required, etc.), quantification of bursting episodes with established criteria revealed that the proportion of preparations in which episodes were observed was greater following hormone than sham treatment (Fig. 2.8) but was still less than preparations from adult frogs (70%; Fig. 2.8B).

Fictive gill ventilation was generally reduced by the hormone incubation protocol; however, the most important decrease was observed in brainstems incubated with aldosterone (alone and combined with T3) and corticosterone (Figs. 2.4B and 2.5E). In many preparations, however, vagal neurograms no longer presented “gill-related” bursting following hormone incubation whereas this activity remained in the facial nerve (Fig. 2.5A). Quantification of this observation is reported in Fig. 2.9.

3.4 CO₂/pH chemosensitivity test

Regardless of hormonal treatment, the chemosensitivity of pre-metamorphic tadpoles was tested on all brainstem preparations (total: n = 71). Prior to incubation, the average response to aCSF acidification was a $234 \pm 66\%$ increase in lung burst frequency (Fig. 2.6A and D). Unlike acidification, the effects of augmenting aCSF pH on fictive air breaths were heterogeneous and the net response was a more modest increase ($90 \pm 44\%$; Fig. 2.6A and D). Conversely, changing aCSF CO₂/pH had no significant effect on gill burst frequency (Fig. 2.6B). For comparison purposes, the chemosensitivity of 18 preparations from adult tadpoles was tested (no incubation). The lung burst response to changes in CO₂/pH was significant but did not differ from that of tadpoles (Fig. 2.6C).

The chemosensitivity of 10 brainstem preparations following 24h incubation with aCSF alone was tested and the frequency of gill and lung-related signals was no longer responsive to changes in CO₂/pH. The lack of CO₂/pH chemosensitivity was also observed following hormone incubation; however, these results are not presented on the figures for conciseness and clarity.

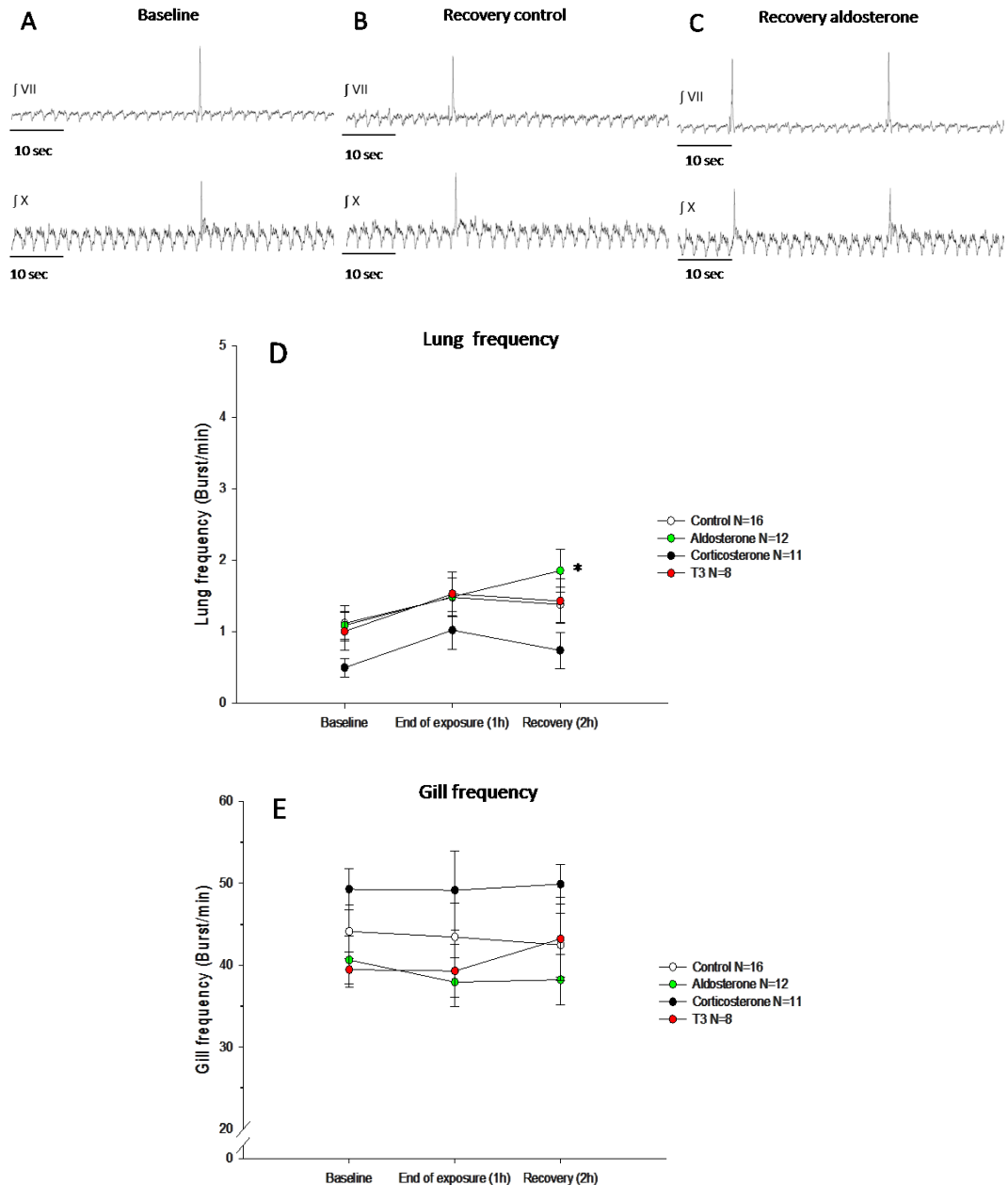


Figure 2.2: Integrated facial (VII) and vagal (X) neurograms comparing the motor output produced by a tadpole brainstem preparation A) at baseline, B) 2h after sham aCSF exposure or C) a different preparation 1h after aldosterone exposure (recovery). Mean D) lung burst frequency and E) gill burst frequency before and after an acute (1h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM) or T3 (100 nM). ANOVA: time effect: $P < 0.0001$. Data are reported as means \pm s.e.m. *Significantly different from the corresponding baseline value at $P < 0.05$.

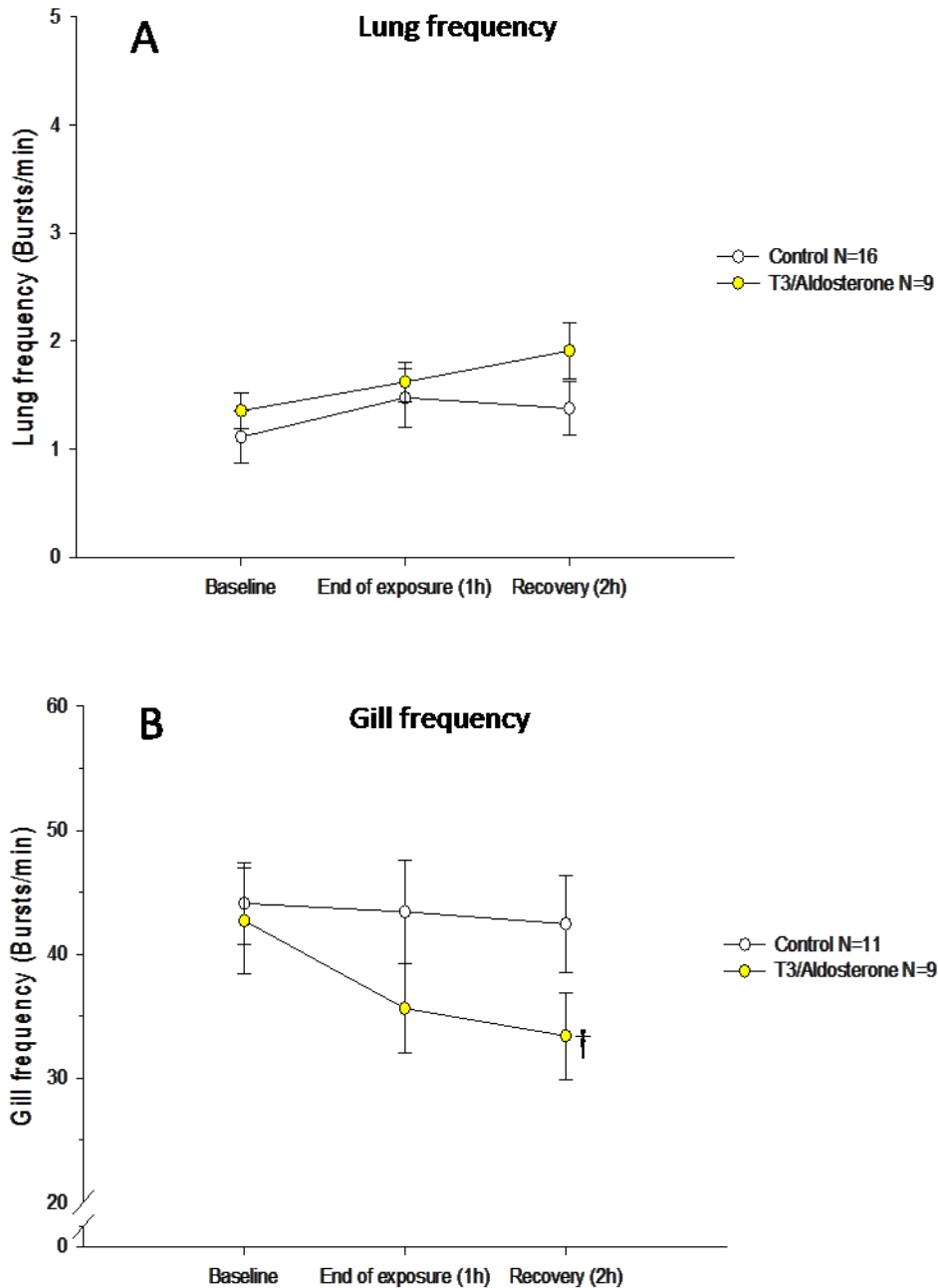


Figure 2.3: Mean A) lung burst frequency and B) gill burst frequency before and after an acute (1h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM). ANOVA: hormone effect: $P = 0.02$. Data are reported as means \pm s.e.m. † Significantly different from the control condition (time control) at $P < 0.05$.

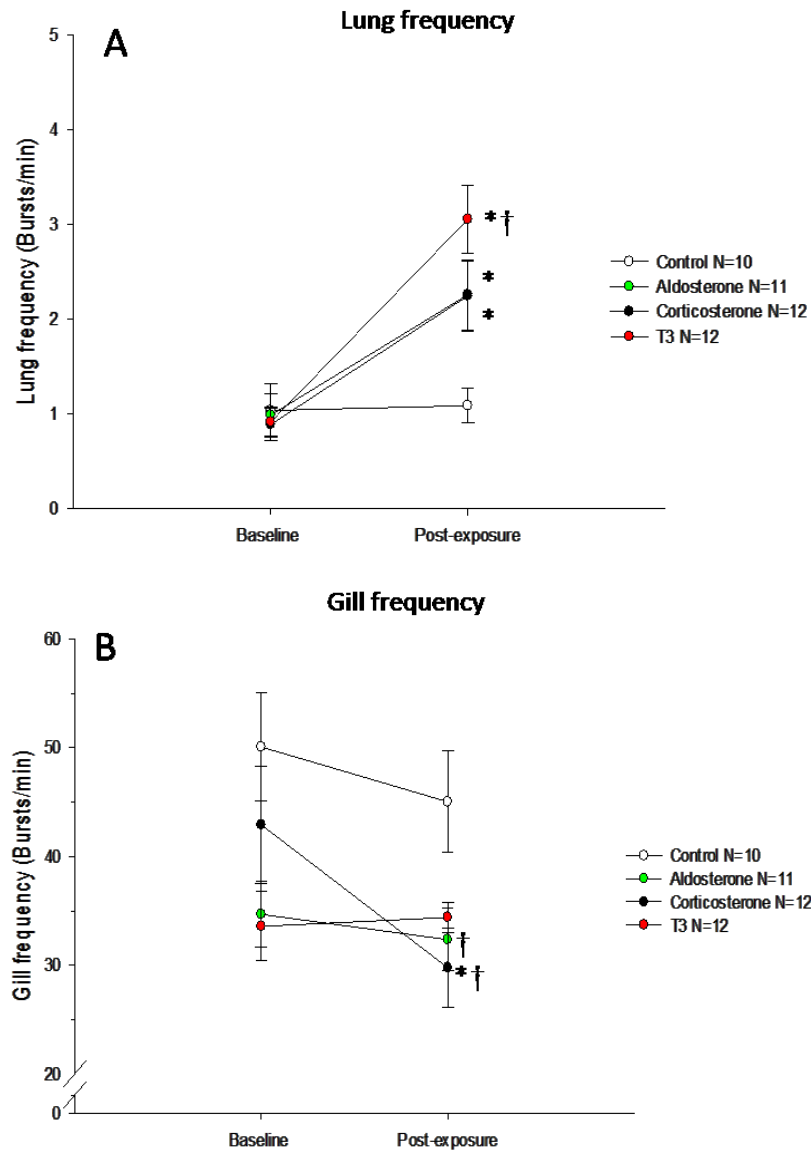


Figure 2.4: Mean A) lung burst frequency and B) gill burst frequency before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM) or T3 (100 nM). ANOVA (Lung): Hormone effect: $P = 0.022$. Time effect: $P < 0.0001$. hormone x Time: $P = 0.012$. ANOVA (Gill): hormone effect: $P = 0.02$. time effect: $P = 0.009$. The analyses did not discriminate whether hormone application was performed individually or in combination. Data are reported as means \pm s.e.m. *Significantly different from the corresponding baseline value at $P < 0.05$. † Significantly different from the control condition (time control) at $P < 0.05$.

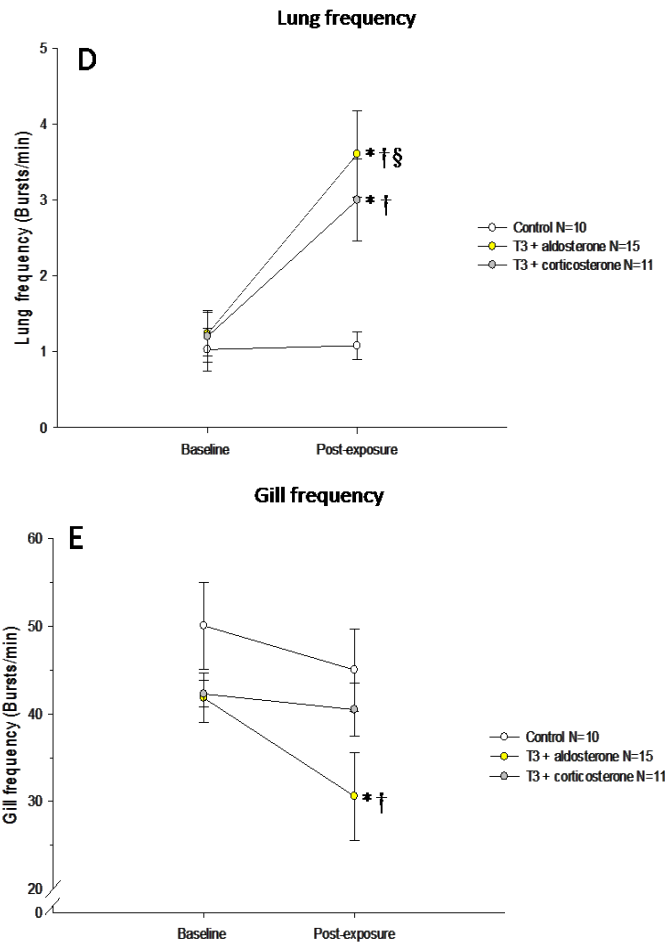
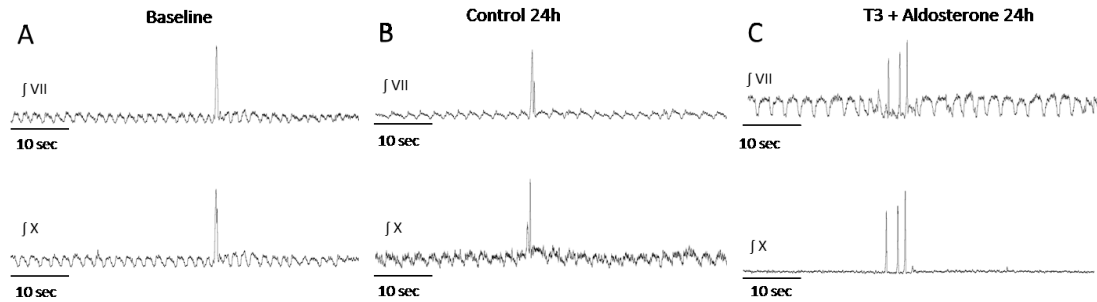


Figure 2.5: Integrated facial (VII) and vagal (X) neurograms comparing the motor output produced by a tadpole brainstem preparation A) at baseline, B) 24h after sham aCSF exposure and C) 24h after T3 + aldosterone exposure. Mean D) lung burst frequency and E) gill burst frequency before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to the sham aCSF (time control) or aCSF with T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM) or T3 + corticosterone (100 nM + 100 nM). Data are reported as means \pm s.e.m. *Significantly different from the corresponding baseline value at $P < 0.05$. † Significantly different from the control condition (time control) at $P < 0.05$. § Significantly different from the aldosterone treatment at $P < 0.05$.

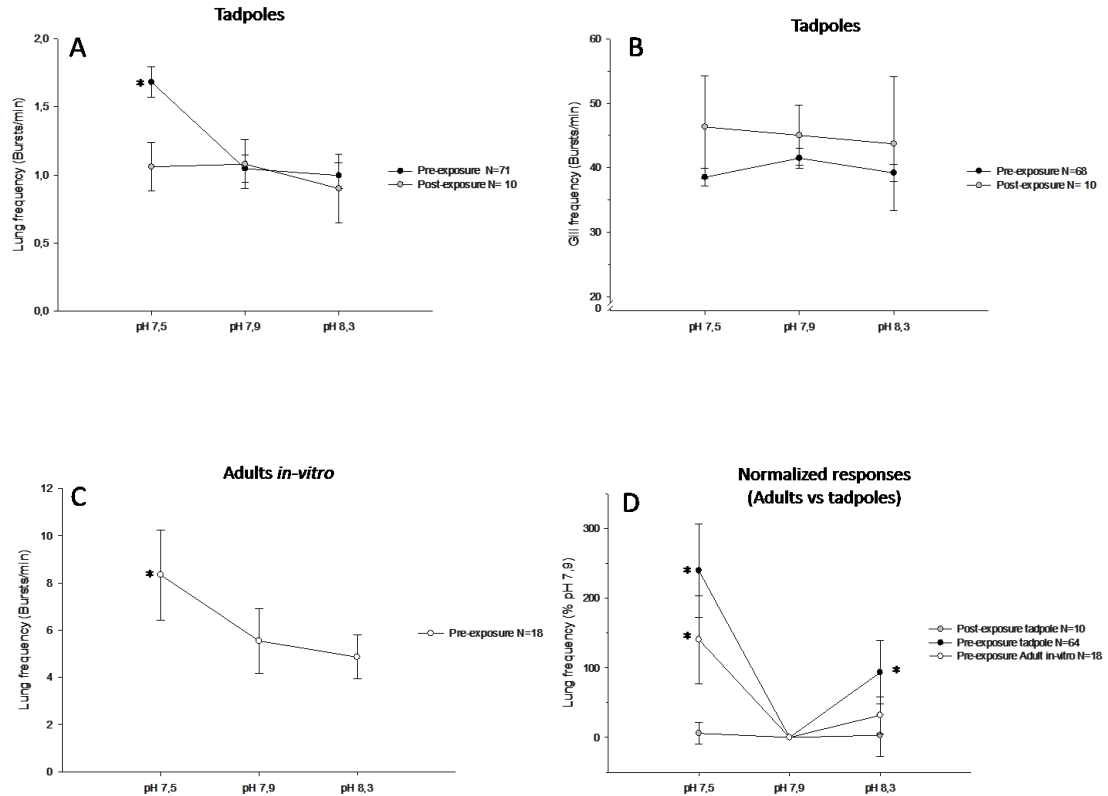


Figure 2.6: The effects of changing aCSF pH on A) Lung burst frequency and B) gill burst frequency in tadpole brainstems before and after the 24h incubation in sham conditions (aCSF alone). ANOVA: Lung burst frequency: pH effect: $P < 0.0001$. C) The effects of changing aCSF pH on lung burst frequency in brainstem preparations from adult frogs shortly after baseline recording (no incubation) ANOVA: pH effect: $P = 0.0084$. D) Changes in lung burst frequency expressed as a percent change from baseline condition (pH 7.9) in tadpoles preparations before and after a 24h sham incubation protocol (aCSF). These results are compared with the response of preparations from adult frogs kept in control conditions (no incubation). ANOVAs: Tadpole pH effect: $P < 0.0001$. Adult pH effect: $P = 0.01$. Data are reported as means \pm s.e.m. *Significantly different from the corresponding baseline value at $P < 0.05$

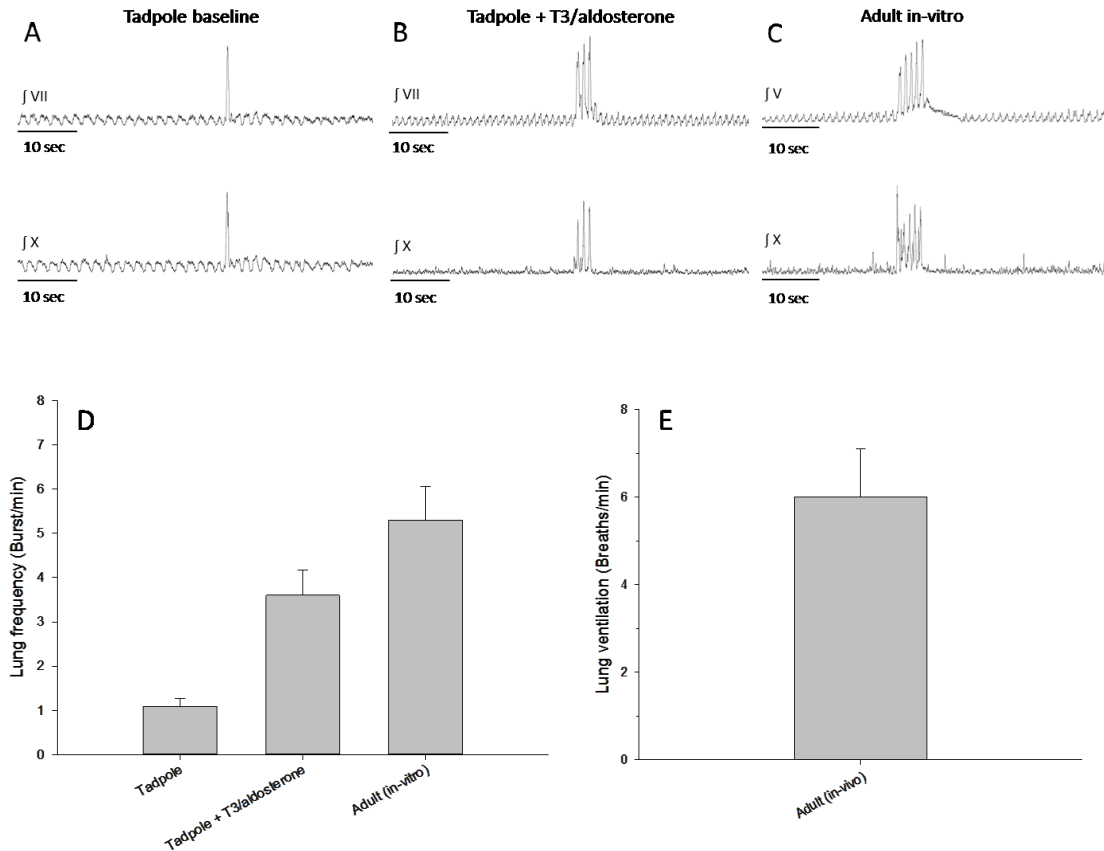


Figure 2.7: Integrated trigeminal (V), Facial (VII) and vagal (X) neurograms of the motor output produced by A) a tadpole under baseline conditions, B) a tadpole 24h after T3 + aldosterone exposure and C) an adult *in-vitro* under baseline conditions. D) Mean fictive air breathing frequency measured in the tadpole following the 24h sham exposure, the tadpole following the 24h T3 + aldosterone exposure, the adult in control conditions (reduced brainstem preparation like the tadpoles) and E) mean lung ventilation in the entire adult animal breathing. Note that the data for adult animals obtained *in vivo* are from Kinkead and Milsom (1994; with permission).

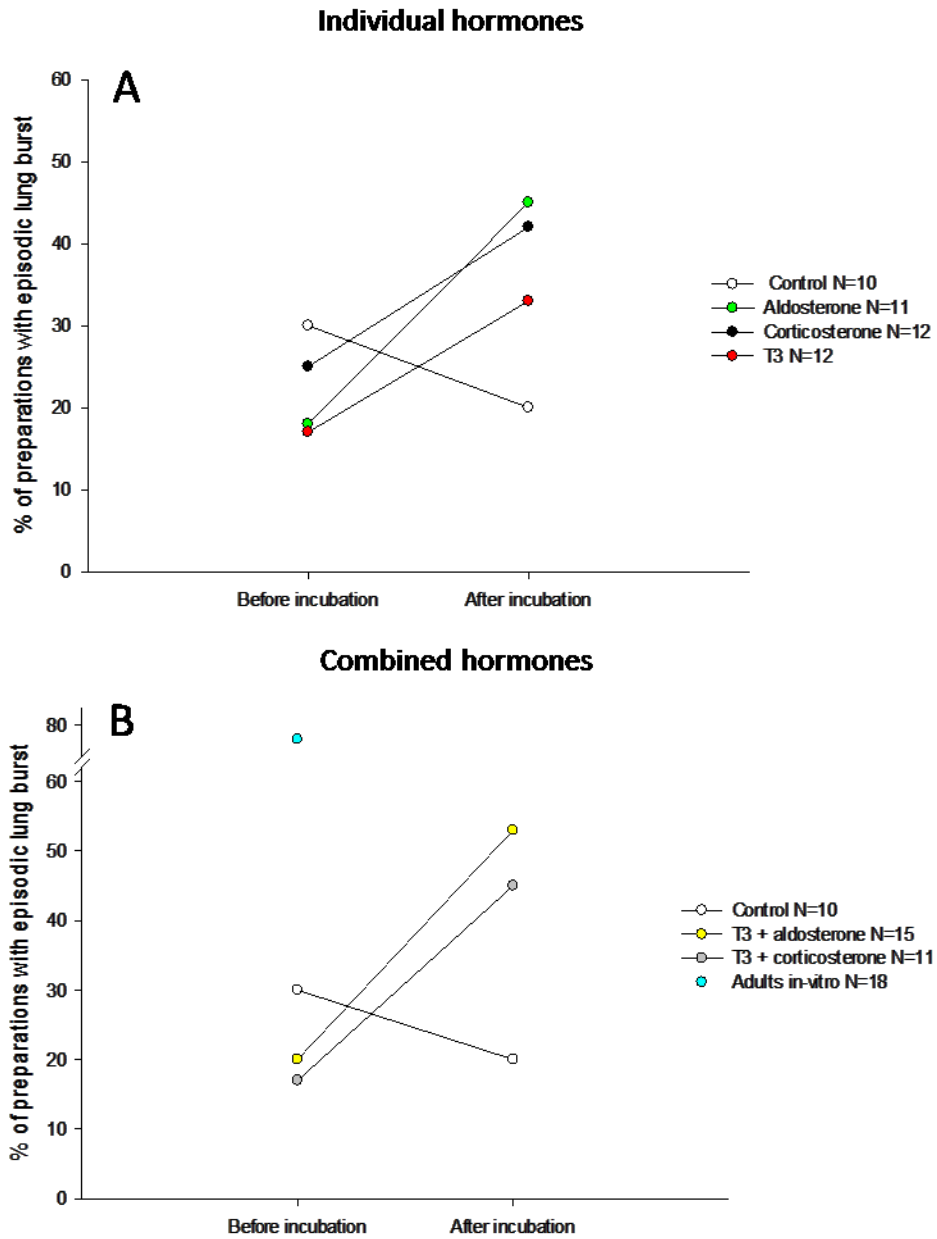


Figure 2.8: The % of tadpole preparations with episodic lung bursts before and after a chronic (24h) exposure of the brainstem preparations to sham aCSF (time control) or aCSF with A) aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM) or T3 (100 nM) and B) T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM), T3 + corticosterone (100 nM + 100 nM) or adults preparations kept in control conditions (no incubation).

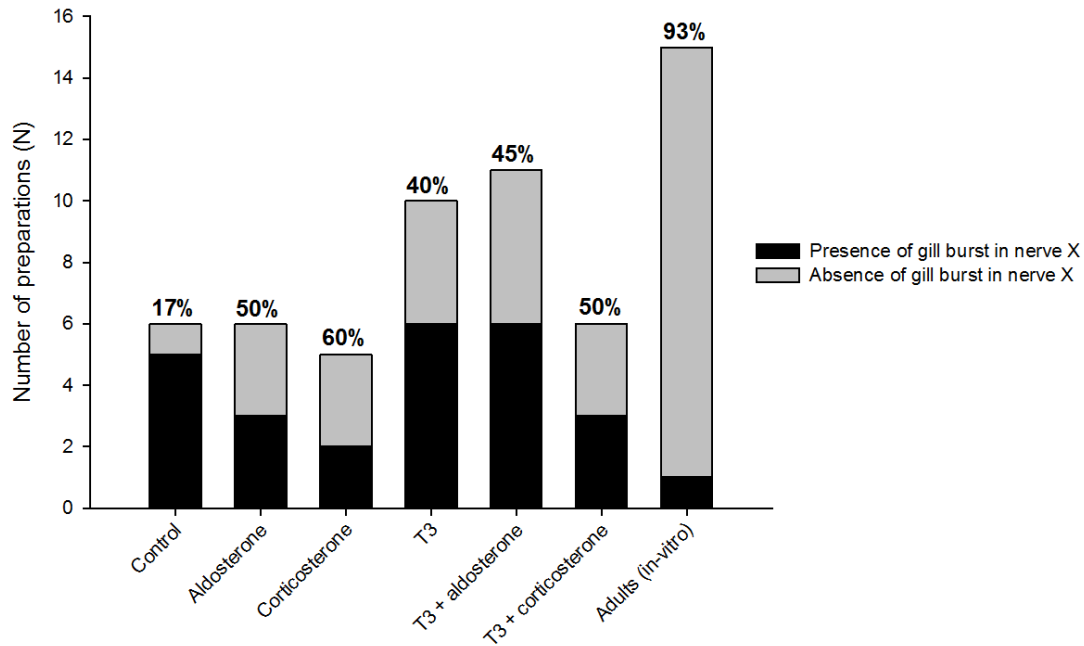


Figure 2.9: Comparison of the number of brainstem preparations without the “gill-related” bursting in the Xth nerve following the 24h incubation in sham aCSF (time control) or aCSF with aldosterone (100 nM), corticosterone (100 nM), T3 (100 nM), T3 + aldosterone (100 nM + 100 nM) or T3 + corticosterone (100 nM + 100 nM). Adult preparations were also tested in control conditions (no incubation). The number above each histogram is the percentage of preparations that do not present gill-related bursting *versus* the total number used in this experimental group.

4. Discussion

Here, we show that prolonged (24h) exposure of tadpole brainstems to hormones regulating metamorphosis can have a profound effect on the neural circuits that regulate breathing. Exposure to aldosterone and corticosterone individually increased lung burst frequency; however, the observation that individual application of T3 produced the highest increase is consistent with the notion that TH is a main actor in the regulation of metamorphosis (Fig. 2.4A). Furthermore, brainstems exposed to T3 and aldosterone simultaneously showed a higher fictive lung frequency compared to aldosterone alone (Fig. 2.5D). This result is consistent with the hypothesis that TH and corticosteroids act in synergy to promote tadpole maturation. As figure 2.7 shows, combining T3 with aldosterone brought fictive air breathing frequency of tadpole preparations closest to the levels observed in adult frogs. Moreover, gill-related activity frequently disappeared from the vagal nerve and the lung bursts episodes were observed and these occasionally displayed a progressive increase from burst to burst. These patterns of activity are reminiscent of those observed in adult frogs, including lung inflation cycles that are more common when the animal faces a respiratory challenge (Kinkead and Milsom, 1994). Together, these results support our initial hypothesis as they indicate that hormones regulating metamorphosis can initiate maturation of the brainstem circuits that produce air breathing. The fact that the increase in burst frequency was not observed in small amplitude (gill related) bursting indicates that these effects do not reflect a generalized increased in activity and that hormones may act specifically on the circuits that regulate the motor command producing air breaths. While these results are highly promising, several issues related to technical limitations and experimental design need to be considered while interpreting these data.

4.1 Critique of methods

The present study aimed to perform “proof of principle” experiments to address the effects of hormones on the core networks regulating breathing. Accordingly, we used doses that were at the superior limits of the levels measured in animals (c.f. section 2.4.1). While this approach was effective, it lacked the

refinement necessary to determine which hormone (or combination) acts as the primary signal initiating respiratory control maturation. At high doses, it is likely that the receptors were saturated and that the responses were near maximum. Moreover, because corticosterone activates both gluco- and mineralo-corticoid receptors, synthetic agonists would have been necessary to discriminate the contribution of each receptor in the responses observed. Clearly, dose-response curves for each individual hormone would have been highly informative, but such detailed work was well beyond the scope of the present investigation.

By comparison with mammals, the amphibian brainstem preparation is viable at all developmental stages and its tolerance to the experimental conditions imposed by acute electrophysiological studies *in vitro* is well established. Here, attempts to record neurorespiratory signals from adult brainstem following 24h incubation with aCSF (time control) indicate that the protocol used in the second series of experiments may have pushed the viability of this preparation close to its limits because at room temperature, most brainstems from adult animals no longer produced activity by the end of the protocol. The factors underlying the non-specific loss of activity in more mature brainstems is unknown but since gas exchange in the tissue is limited under *in vitro* conditions, a reduced tolerance to hypoxia/acidosis is possible at this developmental stage.

Conversely, subjecting tadpoles to the chronic protocol produced a highly rhythmic gill and lung-related motor output. Except for the loss of gill-related bursting in the Xth nerve in some preparations, the overall activity did not differ from the activity recorded prior to the 24h incubation period. However, the fact that none of the preparations responded to changes in CO₂/pH following incubation strongly suggests that the functionality of chemosensing cells has been compromised by the procedure. Obviously, this situation did not allow us to assess the potential contribution of chemosensitive neurons to the increase in lung burst frequency induced by hormone exposure. Further experiments aiming to identify the causes and origins of the loss of chemosensitivity could be useful to improve the incubation protocol and ultimately preserve this function. Despite this limitation, several aspects

of the data indicate that our preparation is sufficiently functional to address our main hypothesis and as we discuss below, factors other than changes in CO₂/pH chemosensitivity may contribute to the increase in lung burst frequency following chronic incubation with hormones.

4.2. Time-dependent effects of hormones on respiratory control maturation

Since corticosteroid injection can increase locomotor activity in rats within minutes (Sandi et al., 1996), it is plausible that these hormones could modulate the respiratory motor command *via* non-genomic actions. However, data showing no change in neurorespiratory activity during the first 1h of incubation do not support a role for membrane receptors respiratory modulation in this species. These first observations are consistent with similar work performed on *Xenopus* (Fournier et al, 2012). By contrast, however, a 1h recuperation period from corticosterone exposure made it possible to double lung burst frequency in *Xenopus* (Fournier et al, 2012) whereas an identical incubation protocol failed to produce a similar result in *Lithobates* tadpoles. The factors underlying this discrepancy are unknown. Based on morphological criteria, we aimed to work on animals at similar developmental stage. However, direct comparisons between species remains difficult such that differences in relative developmental stages between the two studies cannot be excluded. Nevertheless, the results observed in the second series of experiments suggest that a longer exposure was necessary for corticosterone to exert its effects. Unfortunately, the effects of aldosterone were not tested in *Xenopus*. Here, aldosterone exposure was the only treatment in which an increase (albeit modest) in lung burst frequency was observed. Since stress exposure favors an early metamorphosis in *Lithobates catesbeianus* (Denver, 1999, 1993), the low response to corticosteroids and TH observed in our preparations was attributed to the need of a prolonged exposure to allow long term (genomic) effects of hormones to take place.

4.3 Putative mechanisms

While the results of CO₂/pH tests performed prior to chronic incubation further demonstrate that central chemosensitivity is fully functional in pre-metamorphic tadpoles (cf Taylor et al, 2003a,b), the tests performed post-incubation

were inconclusive. However, given that the responsiveness observed in tadpoles did not differ from adults, our results indicate that, in this model system, developmental changes in central chemosensitivity contributes little (if any) to the increase in air breathing in developing tadpoles. We must emphasise that this conclusion is based on *in vitro* results from isolated brainstems that lack sensory afferents. In adult frogs, vagal feedback from the lungs augments the gain of the CO₂/pH chemoreflex (Kinkead et al, 1994; Kinkead & Milsom, 1997) and the strength of this effect in tadpoles is not known. Thus other mechanisms need to be considered to explain how hormones contribute to the increase in lung burst frequency in this species. Maturation of the GABAergic system and developmental changes in the inhibitory action exerted by GABA_B receptors contribute to the emergence of fictive air breathing in developing tadpoles (Straus et al., 2000) and our laboratory provided evidence indicating that corticosterone may help initiate this maturation process (Fournier et al., 2012). It is therefore plausible that aldosterone and even T3 may also act on the GABAergic system. This, in turn, could contribute to the “release of inhibition” that facilitates the expression of lung-related activity in tadpoles (Strauss et al., 2000; Duchcherer et al., 2013). While addressing these effects is beyond the scope of the present study, these experiments could provide valuable insight into the mechanisms by which hormones promote the emergence of air breathing in the developing tadpole.

5. Conclusion and perspectives

Multiples studies have described the complex functional and morphological reorganizations of the respiratory control system of tadpoles that take place over the course of development (Just et al., 1973; Gdovin et al. 1999; Vasilakos et al., 2005; Wilson et al., 2002); however, the mechanisms behind the initiation of the neurological changes leading to the emergence of air breathing remain poorly understood. Here, the increase in air breathing frequency following exposure to hormones regulating metamorphosis clearly shows that the respiratory control system is highly sensitive to hormonal regulation during pre-metamorphic stages and that the ensuing changes likely involve long term (genomic) effects. The sum of these data

are fascinating as they provide new evidences that will help develop new research avenues to further our understanding of respiratory control development in amphibians as well as other groups of vertebrates, including mammals.

6. Acknowledgements

This research was supported by Discovery and Research Tools and Instruments grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). The authors would like to express their gratitude to Mélanie Pelletier for animal care and Pierre-Luc Dubé for technical help for parts of the experiments.

Chapitre III

Discussion

L'objectif premier de ce mémoire était de déterminer si le fonctionnement du système de contrôle respiratoire est influencé par l'hormone thyroïdienne ainsi que les corticostéroïdes au cours du développement de l'amphibien. L'augmentation de la respiration aérienne fictive suite à l'exposition chronique aux hormones démontre que ces centres de contrôle sont effectivement sensibles à la régulation hormonale (Chap. II). La maturation du système respiratoire semble aussi être majoritairement régulée par une synergie entre la TH et les corticostéroïdes puisque c'est avec la combinaison T3 + aldostérone que nous avons observé la plus importante augmentation de fréquence pulmonaire, augmentation beaucoup plus grande que celle provenant de l'application de T3 ou d'aldostérone seules. Suite à l'exposition, la baisse de fréquence branchiale fictive du têtard pré-métamorphique nous laisse supposer que les hormones ont influencé des régions spécifiques du tronc cérébrale afin d'amener ce dernier à produire un patron respiratoire très similaire à celui d'un adulte tant par la fréquence respiratoire que la présence d'une ventilation épisodique.

1. La désinhibition : un mécanisme complémentaire

Avec l'étude de la contribution des hormones à l'émergence de la respiration aérienne, nous avons démontré un accroissement de la fréquence pulmonaire déjà présente chez le têtard pré-métamorphique par l'action ciblée des hormones et le remodelage potentiel du système nerveux. Ce remodelage par les hormones, malgré les résultats innovateurs présentant une réponse claire du tronc cérébral, ne peut cependant être la seule explication d'une émergence précoce de la respiration aérienne lorsque le têtard se retrouve face à un environnement hostile. Dans le cadre de l'étude de la commande respiratoire au niveau central, il est nécessaire de considérer des mécanismes complémentaires à cette amplification de la fréquence pulmonaire par les hormones ainsi qu'une interaction avec différents systèmes du contrôle de la rythmogénèse.

1.1 La maturation du système GABAergique

1.1.1 Maturation du système GABAergique à travers le développement

Comme il a été mentionné auparavant, des bouffées d'air ont été enregistrées chez des têtards de très jeunes stades (TK stade 4) (Torgerson et al., 1997). De plus, grâce à la préparation de tronc cérébral isolé, il a été possible d'observer des influx nerveux pulmonaires au niveau du système nerveux central de têtards pré-métamorphiques (Torgerson et al., 1998). Ces résultats révèlent l'existence d'un générateur de rythme respiratoire pulmonaire fonctionnel dès les plus jeunes stades, qui serait vraisemblablement inhibé jusqu'à la métamorphose où les poumons prennent le dessus dans les échanges gazeux. L'équipe de Straus suggère ici un mécanisme spécifique qui produit un influx inhibiteur empêchant ainsi l'expression du générateur de rythme pulmonaire déjà présent chez le têtard pré-métamorphique (Straus et al., 2000). Ces derniers ont considérés le système GABAergique comme le potentiel acteur dans la suppression pulmonaire avant la métamorphose. Grâce à l'utilisation de préparations de tronc cérébral *in-vitro*, ils ont démontré qu'un blocage du système GABAergique augmente la fréquence pulmonaire fictive dans les stades pré-métamorphiques. Malgré tout, ce blocage n'influence pas la fréquence pulmonaire lorsque la préparation provient d'un stade post-métamorphique. Il y aurait alors une suppression du générateur de rythme respiratoire chez les stades pré-métamorphiques par le système GABAergique, qui serait âge-dépendante et diminuerait donc avec l'avancé à travers les stades (Straus et al., 2000). Ceci expliquerait l'apparition progressive du rythme pulmonaire avec le développement de l'amphibien.

Dans le cadre de cette désinhibition développementale, il est important de comprendre les processus cellulaires qui accompagnent la maturation du système GABAergique. Dans les neurones immatures, il est connu que les gradients de Cl^- ne sont pas encore parfaitement établis. À ce stade, l'activation du récepteur GABA déclenche alors une dépolarisation de la cellule par la sortie du Cl^- . C'est avec la maturation du système GABAergique que l'on assiste à l'inhibition de la cellule (Ben-Ari, 2002). Cette maturation est étroitement liée avec l'expression progressive

au cours du développement d'un exportateur d'ions Cl^- , le KCC2, qui exporte le Cl^- hors de la cellule, modifiant le gradient intracellulaire de l'ion chlorure afin qu'il migre à l'intérieur de la cellule lorsque les canaux GABAergiques sont ouverts (Fig. 3.1) (Ben-Ari, 2002).

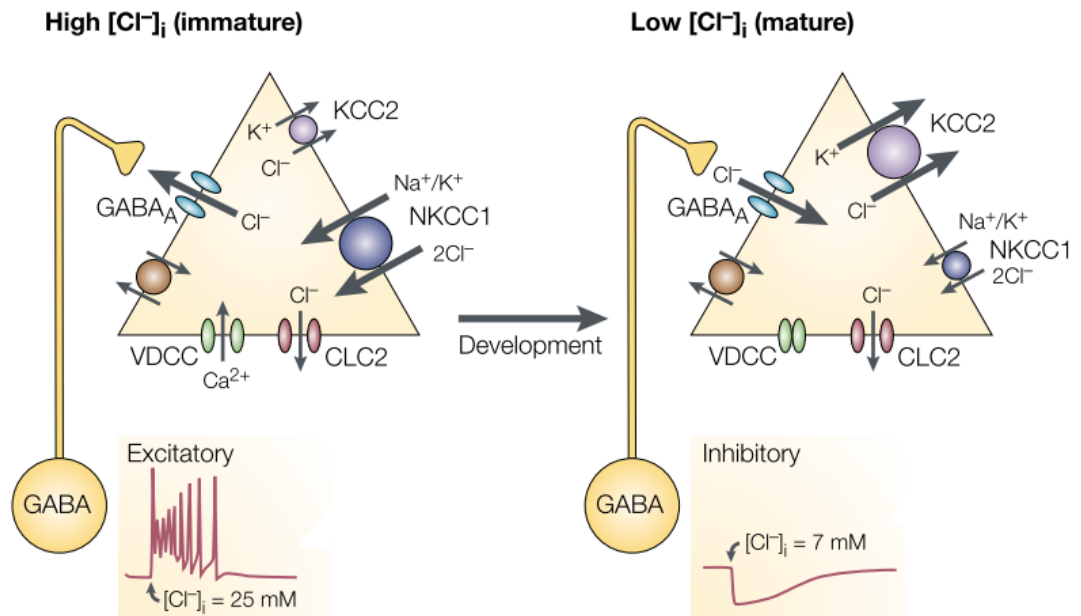


Figure 3.1 : Changements développementaux de la $[\text{Cl}^-]_i$ déterminés par l'expression des co-transporteurs NKCC1 et KCC2 dans les neurones immatures et matures. Tiré de Ben-Ari, 2002

Suite à la compréhension des mécanismes cellulaires impliqués dans la maturation du système GABAergique, nous devons nous questionner sur les affirmations posées par Straus. Ce dernier parle d'une inhibition de la ventilation pulmonaire par le système GABAergique chez les stades pré-métamorphiques alors que le mécanisme cellulaire explique plutôt une dépolarisation (et donc activation) de la cellule lorsque le système GABAergique est immature. Pourquoi une telle contradiction dans les deux processus? Afin de répondre à cette question, Straus définit la désinhibition développementale comme une réduction au cours du développement de l'excitation d'une voie inhibitrice, menant ainsi à la suppression de l'activité de cette voie (Straus et al. 2000). Le système GABAergique n'agirait donc pas directement sur le centre de contrôle pulmonaire, mais plutôt par une structure ou

une voie de signalisation intermédiaire qu'il active tôt dans le développement et inhibe avec l'avancé en âge. Malgré tout, nous sommes dans l'incapacité d'expliquer les mécanismes cellulaires dirigeant la désinhibition observée, car nous en savons encore très peu sur cette voie intermédiaire. De plus amples investigations seraient nécessaires afin de non seulement déterminer le rôle de la voie intermédiaire dans la suppression pulmonaire, mais aussi d'évaluer les changements possibles au niveau des récepteurs GABA pouvant expliquer le changement du comportement de la voie inhibitrice.

1.1.2 Régulation endocrinienne du système GABAergique

Il est maintenant clair que le système GABAergique est un important acteur dans la transition de la respiration aquatique vers aérienne chez l'amphibien et il a récemment été démontré que la maturation de ce dernier pourrait être régulée par le système neuroendocrinien. En effet, l'application de GABA sur une préparation de tronc cérébral de têtard pré-métamorphique préalablement exposée à la corticostérone diminuait la fréquence pulmonaire fictive, alors qu'elle l'augmentait dans le cas d'une préparation non exposée à la corticostérone (Fournier et al., 2012). Cette inversion complète de la réponse au GABA nous laisse suggérer une possible influence de l'hormone dans le processus cellulaire responsable de la maturation du système GABAergique, incluant aussi l'expression progressive de la molécule KCC2. Suite à ces résultats prometteurs, il serait intéressant de vérifier si l'aldostérone et l'hormone thyroïdienne ont un effet similaire à la corticostérone. Nous savons que l'aldostérone peut se lier aux mêmes sites que la corticostérone, ce qui nous laisse supposer qu'elle pourrait aussi influencer la maturation du système GABAergique (Arriza et al., 1988). Dans le cas de la T3, nous en savons encore peu sur son potentiel rôle dans la régulation du système GABAergique. Des études ont démontré qu'elle pouvait augmenter la liaison d'un antagoniste du GABA à son récepteur GABA_A inhibant ainsi la stimulation du flux d'ions Cl⁻ à travers la membrane. Ce processus serait cependant considéré comme un mécanisme non-génomique de l'hormone thyroïdienne afin qu'elle agisse comme un neurotransmetteur ou neuromodulateur dans le cerveau (Martin et al., 1996). Des études supplémentaires

devraient être effectuées afin de déterminer le rôle de l'hormone thyroïdienne dans la maturation du système GABAergique et ainsi s'assurer qu'elle ne représente pas un inhibiteur de cette maturation.

1.2 Les Rhombomères

La notion d'une division du tronc cérébral en plusieurs sections fut présentée dans une publication de Champagnat et Fortin (1997) où ces derniers énoncent une répartition des centres générateurs de la rythmogénèse au cours du développement embryonnaire à travers les huit compartiments segmentaux du tronc cérébral nommés rhombomères. Chaque rhombomère renferme un groupe spécifique de nerfs moteurs crâniens et certains seraient donc des potentiels fournisseurs de progéniteurs pour la formation des circuits générateurs de rythme respiratoire (Bass and Baker, 1997; Goulding and Pfaff, 2005; Straka et al., 2006). Cette notion a été utilisée par Duchcherer (Duchcherer et al., 2013) afin de non seulement expliquer le maintien de la position des générateurs de rythmes respiratoires à travers le développement (oscillateur pulmonaire dans le rhombomère 5 et oscillateur buccal dans le rhombomère 7 peu importe le stade) (Chapitre I, Section 2.1.2), mais aussi afin de confirmer l'hypothèse de la désinhibition respiratoire proposée par Straus (Straus et al., 2000). En effet, un blocage de l'oscillateur buccal situé au niveau du nerf X et donc du rhombomère 7 engendrait l'émergence de la ventilation pulmonaire fictive dans la préparation du tronc cérébral de têtard pré-métamorphique provenant du rhombomère 5 (Duchcherer et al., 2013). Les résultats de Duchcherer démontrent donc que l'oscillateur branchial situé dans le rhombomère 7 vient inhiber l'oscillateur pulmonaire du rhombomère 5 chez le stade pré-métamorphique du têtard (Duchcherer et al., 2013). En se basant sur les hypothèses de Straus présentées précédemment, nous pouvons supposer que l'oscillateur branchial passerait par une maturation à travers le développement, tout comme le système GABAergique et donc que son activité inhibitrice chez les jeunes stades disparaîtrait avec l'âge pour laisser place à la respiration pulmonaire. Tout comme le système GABAergique, la maturation de l'oscillateur branchial pourrait être influencée par les hormones régulatrices de la

métamorphose (TH, corticostéroïdes), mais des études supplémentaires seraient nécessaires afin de nous éclairer sur ce sujet.

2. La chémosensibilité

Une caractéristique importante de la préparation *in-vitro* est l'absence des chémorécepteurs périphériques enlevant ainsi toute influence du système périphérique, ce qui nous permet d'observer la réponse centrale aux différents taux d'O₂ et de CO₂ du milieu sanguin. Une critique importante de notre méthode d'exposition du tronc cérébral aux hormones pendant 24h est la perte de toute chémosensibilité central. Comme il a été mentionné dans le chapitre II, il est possible que l'incubation pousse le cerveau à la limite de sa viabilité, endommageant ainsi les neurones sensibles à l'O₂ et au CO₂, ce qui explique la perte de chémosensibilité. Ce potentiel effet de l'incubation a cependant été développé très rapidement dans la critique des méthodes du chapitre II et mérite d'être plus approfondi dans cette discussion.

2.1 Le CO₂ en tant que stimulus à travers le développement

Comme il a été mentionné dans le chapitre I (Voir Chap. I, Section 3), la transition d'une respiration assurée par les branchies vers une respiration assurée par les poumons est accompagnée d'une augmentation du CO₂ sanguin et un point soulevé par les études de l'ontogénie de la respiration est le potentiel rôle de la chémosensibilité au CO₂/pH en tant que principal stimulus de la respiration aérienne avec le développement de l'amphibien (Milsom 2010). Puisque nous en savons encore très peu sur les mécanismes régulant la chémosensibilité à travers le développement ainsi que l'interaction entre les chémorécepteurs périphériques et centraux, il aurait été intéressant dans le cadre de cette étude d'observer une réponse différente selon le pH de la solution de la part des préparations exposées aux hormones. La plupart des hypothèses soulevées par les différentes équipes de recherche sur la chémosensibilité à travers le développement restent à débattre et certaines en viennent même à se contredire. En effet, lors de l'étude de la réponse à l'hypercapnie, Infantino (1992) n'observait aucune réponse dans la ventilation

branchiale d'un têtard pré-métamorphique, alors que Torgerson (1997) démontrait que la ventilation branchiale répondait de façon importante suite à une stimulation hypercapnique. Les contradictions étaient aussi présentes dans l'analyse de la réponse pulmonaire. Torgerson (1997) et Infantino (1992) observaient une réponse au CO₂/pH dans la ventilation pulmonaire seulement chez les stades post-métamorphiques, tandis que Taylor (2003 a, b) a récemment démontré une augmentation de la ventilation pulmonaire chez tous les stades développementaux suite à l'exposition d'une préparation de tronc cérébral isolé à une solution hypercapnique. Face à ces multiples hypothèses, il aurait été intéressant d'apporter de l'information nouvelle sur la réponse centrale au CO₂/pH ainsi qu'à l'O₂ au cours du développement.

2.2 Implication de la chémosensibilité périphérique dans la réponse ventilatoire

Une récente étude de la part d'une étudiante de notre laboratoire a cependant permis d'éclaircir certains questionnements sur le chémoréflexe de l'amphibien. L'étudiante a injecté des têtards pré-métamorphiques simultanément avec les mêmes concentrations de T3 et d'aldostérone que celles utilisées dans le projet de maîtrise pour ensuite enregistrer sur l'animal entier la ventilation pulmonaire et branchiale 24h suivant l'injection. Il est tout d'abord important de mentionner qu'elle a observé une augmentation de la ventilation pulmonaire chez les têtards injectés ainsi qu'une légère diminution de la ventilation branchiale, deux résultats qui viennent corroborer notre étude *in-vitro*. Outre les mesures de la ventilation de base de l'animal, l'étudiante a aussi effectué des tests d'hypoxie, d'hyperoxie et de CO₂. Les résultats démontrent une réponse à l'O₂ tant chez les têtards injectés que chez les contrôles, mais aucune différence entre les deux groupes ne pouvait être observée. Pour sa part, la réponse au CO₂ présentait elle aussi aucune différence entre les groupes. Il semblerait donc que la réponse à l'O₂ et au CO₂ soit présente peu importe le stade développementale, mais que les hormones métamorphiques n'aient aucune influence sur la régulation de cette réponse. Comme il a été supposé dans l'article (Chap. II), l'émergence de la respiration aérienne pourrait être régulée par des mécanismes autres que la chémosensibilité au CO₂/pH.

3. Influence du sexe sur la réponse respiratoire

3.1 Régulation de l'axe du stress

Au cours de l'étude *in-vitro* de l'influence des hormones sur le contrôle respiratoire, nous nous sommes questionnés sur l'importance d'évaluer le sexe et son influence dans la régulation endocrinienne de l'émergence de la respiration aérienne au cours du développement. Il est en effet connu que le contrôle de la respiration diffère selon le sexe de l'animal (Wenninger et al., 2009) et plusieurs recherches ont démontré que les hormones stéroïdiennes sexuelles (testostérone, estrogène, progestérone) influencent le développement neural, la plasticité respiratoire ainsi que le contrôle neural de la respiration (Holley et al., 2012). Les hormones sexuelles n'influencent pas seulement la respiration, mais aussi l'activité de l'axe du stress. Des études sur les mammifères ont d'ailleurs rapporté avoir observé des différences entre les sexes dans la réponse de l'axe HPA face à un stress environnemental (McCormick et al., 1995). Il a été démontré que le stress prénatal augmentait les niveaux plasmatiques d'ACTH et de corticostérone chez des rats femelles adultes restreintes, mais ce phénomène n'était pas présent chez les mâles (McCormick et al., 1995). De plus, 14 jours suivant la naissance, les niveaux de base d'ACTH, mais non de corticostérone étaient nettement plus élevés chez les nouveau-nés femelles provenant d'une mère stressée que chez les mâles (Takahashi et al., 1990). L'effet du stress gestationnel serait donc beaucoup plus marqué chez les femelles que chez les mâles et cette différence pourrait être expliquée par l'impact des hormones sexuelles sur le développement de l'axe HPA. La testostérone est connue pour altérer l'activité de l'axe HPA et pourrait ainsi expliquer la faible réponse du mâle au stress, causée par une voie de suppression adrénocorticale activée lors du stress *in-utero* (Matthews, 2002). Cette potentielle interférence des hormones sexuelle a aussi été soulevée lors d'une étude où des femelles ayant subi le stress gestationnel présentaient une réponse moins importante lors de la phase lutéale tardive, phase au cours de laquelle le phénotype de l'axe HPA est similaire à celui du mâle (Liu et al., 2001). Il a donc été démontré que nous avons une réponse différente au stress selon le sexe chez les mammifères et l'homologie du système endocrinien entre les mammifères et

l'amphibien nous porte à croire que cette différence dans la réponse pourrait aussi être observée chez l'amphibien.

3.2 Détermination du sexe chez le têtard pré-métamorphique

La technique de détermination des sexes a déjà été utilisée dans une publication de Hsü (Hsü et Liang, 1970). La différenciation commence au stade III de l'animal, mais à cet âge, il est presque impossible de faire la différence entre les deux structures (Fig. 3.2). Selon Hsü, c'est à partir du stade X que nous pouvons différencier les ovaires des testicules. L'observation doit être faite sous un microscope de dissection et cette dernière demande des manipulations très précises qui sont néanmoins réalisables. Dans le cadre de notre étude, il est cependant intéressant d'utiliser des jeunes stades qui se situent entre V et XV. Les stades sous la barre des X seraient alors perdus en ce qui concerne la différenciation des sexes. Sur la base d'une étude du développement respiratoire, je crois que nous éliminerions un groupe important de têtards en utilisant seulement les animaux de stade X et plus, notamment en considérant qu'une respiration pulmonaire peut être observée chez des stades aussi jeunes que IV (Torgerson et al., 1997). Il est de plus reconnu que l'espèce *Lithobates catesbeianus* possède des groupes dont le sexe demeure indifférent de la naissance jusqu'à 6 mois suivant la métamorphose (Hsü et Liang, 1970). Le sexe de l'amphibien peut aussi être influencé au cours de la métamorphose par certains facteurs environnementaux comme la température de l'eau qui change les ovaires en testicules lors d'exposition à une température trop élevée (Hsü et al., 1971). Il serait cependant possible de déterminer le sexe de l'amphibien par une méthode de génotypage en utilisant le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) (Olmstead et al., 2010). Chacun de ces facteurs demandent malgré tout des procédures complémentaires qui étaient selon nous hors de l'objectif du projet de maîtrise. D'autre part, l'étude du sexe de l'amphibien sur la respiration peut être facilement effectuée chez les adultes. Des résultats provenant de l'espèce *Xenopus laevis* montrent une réponse à l'hypoxie beaucoup plus prononcée chez le mâle contrairement à la femelle (Résultats provenant du laboratoire de Richard Kinkead, non publiés). Le sexe pourrait donc influencer le développement des centres

de contrôle de la respiration de l'amphibien et des études sur cette différenciation apporteront probablement des données intéressantes dans le domaine du contrôle respiratoire. En complément, sachant que le stress thermique affecte la masculinisation/féminisation de l'amphibien, il serait intéressant de voir si les injections d'hormones affectent cette différenciation sexuelle ou ont des effets sexe-dépendants.

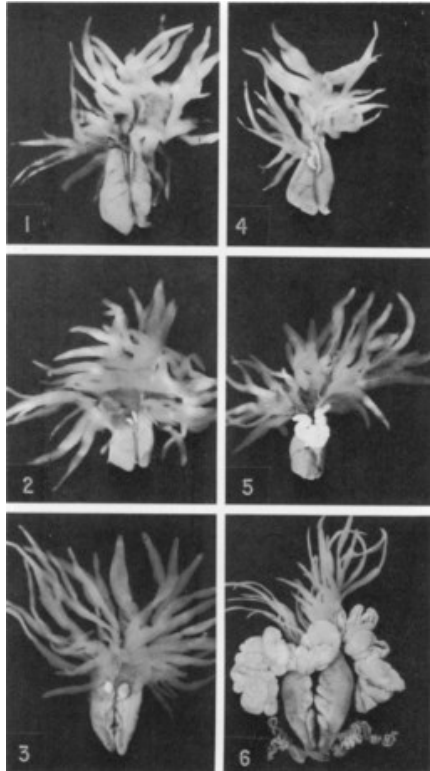


Figure 3.2 : Testicules (1-3) et ovaires (4-6) recueillis chez *Lithobates catesbeianus* au stade III (1 et 4), au stade XX (2 et 5) et deux mois après la métamorphose (3 et 6).

Grossissement : 1.5X

Tiré de Hsü et Liang, 1970

4. Approches alternatives

La technique d'incubation du tronc cérébral en entier sur une période de 24h fut développée afin d'avoir une diffusion complète des hormones à travers les tissus et ainsi s'assurer que tous les centres de contrôle respiratoire soient en constant contact avec les hormones au cours de la période d'incubation. De plus, procéder aux enregistrements sur 24h suivant la mise en bouteille nous a permis de confirmer la présence des récepteurs des corticostéroïdes et de l'hormone thyroïdienne dans le tronc cérébral ainsi qu'un effet génomique des hormones sur le remodelage du système nerveux central. Malgré l'utilisation selon nous justifiée de cette technique pour l'étude, nous aurions pu utiliser des approches alternatives dans le but de viser des zones précises responsables du contrôle respiratoire.

4.1 La méthode «Sheep-Dip»

La méthode de «Sheep-Dip» est une technique nouvelle dans le domaine de l'électrophysiologie respiratoire. Contrairement au procédé de base de l'enregistrement sur tronc cérébral isolé où la préparation est submergée dans un liquide céphalo-rachidien artificiel constamment renouvelé, la technique du «Sheep-Dip» consiste à installer le tronc cérébral verticalement dans la chambre d'enregistrement (Fig. 3.3). Au lieu de procéder à une immersion complète du tronc-cérébral, le liquide céphalo-rachidien coule constamment sur la préparation à partir du haut de la chambre. La préparation peut alors être plongée en partie dans une seconde chambre qui contient un liquide pouvant avoir plusieurs fonctions selon le type de procédure. Dans le cadre de la recherche de Duchcherer et son équipe (Duchcherer et al., 2013) le liquide était constitué d'une forte dose de Mg^{2+} et d'une faible dose de Ca^{2+} afin de bloquer les synapses par une faible entrée de calcium et ainsi inhiber l'activité d'une zone précise du tronc cérébrale. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'effectuer une ablation chimique réversible qui réduit le risque de dommages aux axones. La technique du «Sheep-Dip» a bien sur ses avantages et désavantages. Contrairement aux micro-injections de drogues qui assurent un effet précis et une pénétration profonde de la drogue, il est impossible d'assurer une profondeur précise avec le «Sheep-Dip». Cependant, il permet une

application de la drogue sur une grande région de la préparation, ce qui est avantageux lorsqu'on étudie une voie neural avec plusieurs interactions où un blocage local pourrait être compensé par le reste du système neural relié à cette voie (Duchcherer et al., 2013).

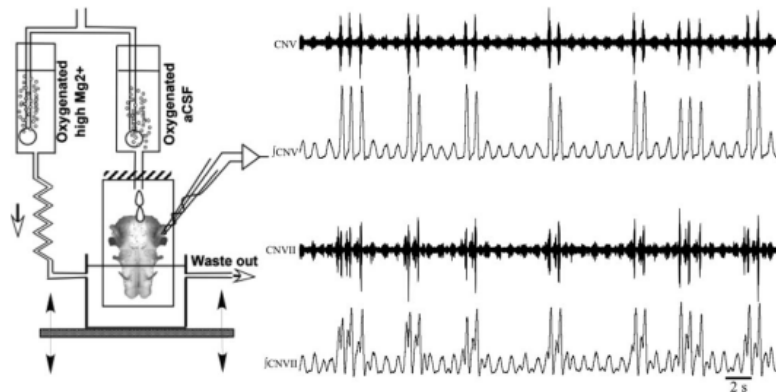


Figure 3.3 : Technique d'enregistrement électrophysiologique «Sheep-Dip». Les neurogrammes représentent l'activité respiratoire fictive enregistrée à partir des nerfs crâniens Trijumeaux (V) et Facial (VII). Tiré de Duchcherer et al., 2013.

4.2 La technique «Split-bath»

La technique «Split-bath» est très similaire à la technique que nous avons utilisée dans les enregistrements électrophysiologiques sur tronc cérébral isolé. Cependant, la préparation n'est pas immergée en entier dans une même solution. Grâce à une membrane de plastique et de vaseline, une séparation de la chambre incluant le tronc cérébral peut être effectuée, ce qui permet d'irriguer chaque compartiment avec une solution de liquide céphalorachidien artificiel (LCRa) différente. Cette technique a été utilisée par Johnson et Mitchell (1998) avec une préparation de tortue où ils ont séparé le tronc cérébral et la moelle épinière (Fig. 3.4).

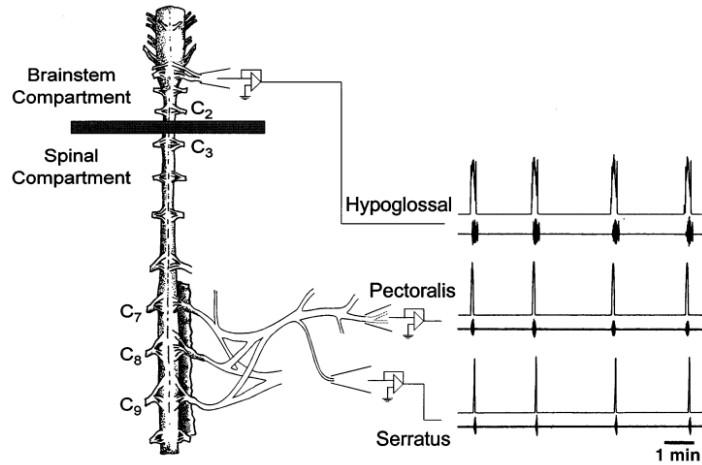


Figure 3.4 : Technique d'enregistrement électrophysiologique «Split-bath». La bande noire représente la barrière séparant la chambre d'enregistrement en deux compartiments non connectés. Tiré de Johnson et Mitchell, 1998

4.3 Liens potentiels avec notre protocole

Dans le cadre de l'étude de l'effet des hormones métamorphiques sur le développement du système de contrôle respiratoire, nous pourrions procéder à l'exposition de régions spécifiques du tronc cérébral aux hormones. Nous serions alors en mesure d'approfondir les connaissances sur l'emplacement des différents récepteurs dans le tronc cérébral. En accord avec nos observations, des études ont déjà démontré que les récepteurs thyroïdiens ainsi que les récepteurs glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes sont présents dans les tissus du système nerveux central (Brown et Cai, 2007; Arriza et al., 1988), mais leur emplacement exact dans le tronc cérébral reste à confirmer. En plus d'aider à la localisation des récepteurs, la combinaison des différentes techniques d'enregistrement électrophysiologique élargirait notre savoir sur l'interaction des hormones métamorphiques avec d'autres voies de signalisation dans le remodelage du système de contrôle respiratoire. Le rhombomère 5 contenant le générateur de rythme pulmonaire serait une cible de choix dans cette pratique. Avec la technique du «Split-bath», il pourrait être très intéressant d'effectuer simultanément un blocage du rhombomère 7 contenant le générateur de rythme branchial inhibiteur de la respiration pulmonaire ainsi qu'une activation du rhombomère 5 par les hormones métamorphiques. Cette combinaison

pourrait grandement améliorer la réponse du tronc cérébral puisque nous accélérerions le processus de désinhibition développementale. La technique du «Sheep-Dip» pourrait aussi être utilisée dans la détection des centres sensibles à l'O₂ et au CO₂ ainsi que leur possible déplacement au cours du développement de l'amphibien (Voir Chap. I, Section 3). Il est cependant important de considérer la raison principale pour laquelle nous avons procédé à l'incubation en bouteille sur 24h. L'irrigation constante, proposée dans la technique du «Sheep-dip» et du «Split-bath» demande des quantités importantes de LCRA et surtout une alimentation continue en gaz. Ce facteur peut être limitant, d'où notre utilisation de bouteilles fermées hermétiquement. Malgré tout, si nous ne considérons pas les inconvénients techniques de l'irrigation continue, un croisement des manipulations proposées ci-dessus avec notre protocole ouvrirait des portes sur la compréhension anatomique des zones responsables du contrôle respiratoire ainsi que leurs interactions. Finalement, comme il a été mentionné précédemment (Chapitre III, Section 4.1), la micro-injection d'hormones dans une région spécifique assurerait une diffusion profonde du produit dans les tissus ainsi qu'une certitude que la zone voulue soit en contact avec les hormones (Duchcherer et al., 2013). Cette technique demanderait cependant une répétition dans le processus d'injection afin d'avoir une réponse à l'exposition chronique (24h) aux hormones, ce qui nous porte à croire que l'incubation dans le liquide céphalorachidien reste à ce jour une technique très fiable pour répondre à nos questions.

5. Perspectives futures et retombées dans la recherche clinique

5.1 Homologie du système de contrôle de la respiration : Amphibien vs Mammifères

Malgré leur distance phylogénétique, le développement du contrôle respiratoire des mammifères reste très similaire à celui de l'amphibien. Tout comme le mammifère, la grenouille adulte doit contrôler la ventilation pulmonaire afin de maintenir l'homéostasie de ses concentrations de gaz sanguins (O₂ et CO₂). Chez les deux espèces, cette ventilation nécessite une coordination des structures sensorielles périphériques et des mécanismes intégrateurs et effecteurs situés dans le système

nerveux central qui sont mis en place selon une séquence précise au cours du développement afin d'assurer une transition parfaite de la vie aquatique vers la vie terrestre. Cette transition peut être autant in utero chez le mammifère qu'extérieure chez l'amphibien, elle n'en reste pas moins semblable au niveau de la machinerie respiratoire. Plusieurs aspects du développement neural et du contrôle respiratoire sont semblables entre les amphibiens et les mammifères, mais un très bon exemple serait le complexe pré-Bötzinger qui interagit avec le groupe respiratoire para-facial afin de contrôler la respiration, un concept similaire au double jeu d'oscillateurs présenté chez l'amphibien (Chapitre I, Section 2.1.1).

L'axe du stress neuroendocrinien représente aussi un système de signalisation qui est apparu depuis très longtemps et a été gardé à travers l'évolution afin d'accommoder le développement de la larve et du fœtus à son prochain environnement (Crespi and Denver, 2005). Tant chez le mammifère que chez l'amphibien, les corticostéroïdes et le CRF agissent au niveau central et périphérique afin d'altérer le développement de l'individu face à un environnement hostile. Les mécanismes de cette régulation sont conservés à travers les espèces de vertébrés nous permettant de comparer les réponses de chacune lors d'un stress environnemental.

5.2 Un apport de l'étude à la recherche clinique?

La compréhension du rôle des hormones thyroïdiennes et des corticostéroïdes est avant tout une importante étape dans l'avancée de notre connaissance du développement respiratoire de l'amphibien et des mammifères, mais rien n'empêche que ces résultats puissent être utilisés afin d'aider la recherche clinique à mieux comprendre le développement intra-utérin du système respiratoire et ainsi élaborer des traitements pour les nouveau-nés prématurés qui présentent une déficience dans le contrôle respiratoire.

Dans le cadre des changements phénotypiques résultants d'un stress éprouvé tôt dans la vie de l'animal, les effets de l'environnement sur le développement ainsi que la croissance de l'amphibien peuvent être mis en parallèle avec le stress intra-

utérin qui modifie la croissance fœtale et le développement des mammifères. Pour les mammifères, on ne parle cependant plus d'assèchement de l'étang ou d'augmentation de la compétition pour les ressources, mais plutôt de malnutrition maternelle ou d'expositions répétitives à un stress aigu. Ce stress intra-utérin cause chez le fœtus un retard de la croissance ainsi qu'une naissance prématurée, phénomène comparable à la métamorphose accélérée du têtard (Bloomfield et al., 2003; Challis et al., 2001). Ces facteurs ont été reconnus comme susceptibles d'altérer les fonctions reproductives, mais aussi d'augmenter les risques de maladie avec l'avancée de l'âge (Weinstock, 2001). La cause de ces effets néfastes sur la santé de l'enfant serait une activation prématurée du système neuroendocrinien en réponse au stress ayant pour conséquence une élévation des glucocorticoïdes dans le plasma. Cette élévation, à une période critique du développement du cerveau, peut altérer de façon permanente le fonctionnement de l'axe du stress (HPA) (Matthews, 2002). La programmation de l'axe du stress est-elle cependant si néfaste dans le cadre du développement du contrôle respiratoire chez l'amphibien ainsi que chez l'humain?

Une importante conclusion de l'étude du développement respiratoire est que les hormones métamorphiques (T3, corticostéroïdes) accélèrent le développement de la commande motrice pour la respiration aérienne en cas de stress. Certes, un stress créé par l'environnement hostile accélère l'émergence de la respiration aérienne afin que le têtard ait accès à un domaine plus favorable à sa croissance, mais l'animal sort de son ancien milieu avec une taille plus petite et diminue ainsi ses chances de reproduction et de survie dans le nouvel environnement (Crespi et Denver, 2005). Qu'en est-il pour un humain? Il est clair qu'une activation de l'axe du stress augmente les chances de maladies chez le nouveau-né, mais l'utilisation de corticostéroïdes a déjà été effectuée afin d'aider au développement pulmonaire. En effet, le traitement de mères gestantes avec des glucocorticoïdes synthétiques est couramment utilisé pour contrer les effets néfastes des naissances prématurées. Les glucocorticoïdes sont utilisés ici pour accélérer le développement des poumons et ainsi aider le nouveau-né à respirer normalement à la naissance (Gilstrap et al., 2000). L'hormone thyroïdienne est aussi essentielle au développement neurologique du fœtus et du nouveau-né. Il a été démontré que les enfants prématurés présentent des

taux d'hormones thyroïdiennes bien en dessous de la moyenne et sont incapables d'initier l'importante augmentation postnatale d'hormone thyroïdienne normalement aperçue de 24 à 48 heures suivant la naissance (Biswas et al., 2002). Ce déficit est relié à un plus haut taux de décès chez les bébés humains ainsi qu'une plus grande dépendance ventilatoire après deux semaines de vie (Biswas et al., 2002). Dans le cadre de cette étude, il est selon moi nécessaire de ne pas considérer les effets du stress sur les chances de survie tant du têtard que de l'humain, mais plutôt de se concentrer sur l'effet des hormones dans le développement du système de contrôle respiratoire et utiliser l'homologie entre l'amphibien et l'humain au niveau des mécanismes responsables de la régulation du développement neural.

5.3 Perspectives futures

Il est bien sûr intéressant d'explorer les possibles retombées cliniques grâce à l'analyse des résultats de notre étude, mais à la fin de ce mémoire, il est selon moi important de déterminer quelle serait la continuité de ce projet dans le domaine fondamental et donc de se concentrer sur la compréhension des mécanismes régulateurs du développement du système de contrôle respiratoire. Plusieurs pistes sont possibles, mais voici les priorités en lien avec notre étude. La première suite logique serait d'examiner l'impact de l'hormone thyroïdienne et des corticostéroïdes sur le développement respiratoire de l'animal entier, ce qui nous permettrait d'intégrer la potentielle action des chémorécepteurs périphériques et aussi voir l'influence de structures complémentaires à la régulation de la respiration à travers le développement. Nous perdons bien sûr la précision dans l'évaluation des chémorécepteurs centraux, mais nous serons en mesure de répondre à des questions supplémentaires qui ne pouvaient être résolues par la préparation *in-vitro* (impact des chémorécepteurs périphériques, influence de structures supplémentaires dans le contrôle respiratoire). Une étudiante du laboratoire a déjà effectué des observations préliminaires (Chapitre 3, Section 1) et les résultats qui en ressortent sont très convaincants. Dû au stade encore précoce de l'étude, les résultats n'ont pas été intégrés dans le présent mémoire. Ces derniers seront cependant évalués plus en profondeur et feront certainement partie d'une publication dans les années à venir.

Comme il a été mentionné, combiner notre protocole d'incubation sur 24h avec la méthode «Sheep-Dip» ou «Split-bath» sera aussi un atout intéressant dans l'étude de la régulation hormonale du développement du système de contrôle respiratoire. Finalement, une approche avec les rongeurs pourrait être effectuée afin de mieux comprendre les processus du contrôle neuroendocrinien sur le développement respiratoire du mammifère. Le processus de transition d'une respiration aquatique vers aérienne de l'amphibien est initié par un pic de sécrétion d'hormone thyroïdienne, principal morphogène jouant un rôle central dans la régulation de la métamorphose et l'approche électrophysiologique a démontré clairement qu'une incubation de 24h en présence de T3 est suffisante pour augmenter de façon spécifique la respiration aérienne fictive chez cette espèce. Puisque le rongeur et l'humain montrent aussi ce pic d'hormone thyroïdienne à une période critique du développement du système neural, il serait intéressant d'élargir cette étude en testant l'hypothèse proposant que les hormones thyroïdiennes soient essentielles au développement des circuits respiratoires du rongeur nouveau-né.

Bibliographie

Adrian ED, Buytendijk FJ (1931) Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish. *J Physiol* 71:121-135.

Allen BM (1925) The effects of extirpation of the thyroid and pituitary glands upon the limb development of anurans. *J Exp Zool* 42:13-30.

Anctil M, Baguet F, Charmantier M, Charmantier G, Gilles R, Péqueux A, Plumier J.C., Sébert P. (2006) *Physiologie Animale*. Bruxelles: Édition De Boeck Université, 668 p.

Arriza JL, Simerly RB, Swanson LW, Evans RM (1988) The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* 1:887-900.

Bartel H, Lametschwandtner A (2000) Regression of blood vessels in the ventral velum of *Xenopus laevis* Daudin during metamorphosis: light microscopic and transmission electron microscopic study. *J Anat* 197 (Pt 2):157-166.

Bass AH, Baker R (1997) Phenotypic specification of hindbrain rhombomeres and the origins of rhythmic circuits in vertebrates. *Brain Behav Evol* 50 Suppl 1:3-16.

Beato M, Sanchez-Pacheco A (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17:587-609.

Beaudoin AR (1956) The development of lateral motor column cells in the lumbosacral cord in *Rana pipiens*. II. Development under the influence of thyroxin. *Anat Rec* 125:247-259.

Beck CW, Congdon JD (1999) Effects of individual variation in age and size at metamorphosis on growth and survivorship of Southern Toad (*Bufo terrestris*) metamorphs. *Can J Zool* 77:944-951.

Beck CW, Congdon JD (2000) Effects of age and size at metamorphosis on performance and metabolic rates of Southern Toad, *Bufo terrestris*, metamorphs. *Funct Ecol* 14:32-38.

Belzile O, Simard E, Gulemetova R, Bairam A, Kinkead R (2004) Amphibians as a model system for the investigation of respiratory control development. *Med Sci (Paris)* 20:904-908.

Behan M, Kinkead R (2011) Neuronal control of breathing: sex and stress hormones. *Compr Physiol* 1:2101-2139.

Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3:728-739.

Biswas S, Buffery J, Enoch H, Bland JM, Walters D, Markiewicz M (2002) A longitudinal assessment of thyroid hormone concentrations in preterm infants younger than 30 weeks' gestation during the first 2 weeks of life and their relationship to outcome. *Pediatrics* 109:222-227.

Bloomfield FH, Oliver MH, Hawkins P, Campbell M, Phillips DJ, Gluckman PD, Challis JR, Harding JE (2003) A periconceptual nutritional origin for noninfectious preterm birth. *Science* 300:606.

Bonett RM, Hoopfer ED, Denver RJ (2010) Molecular mechanisms of corticosteroid synergy with thyroid hormone during tadpole metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol* 168:209-219.

Boutilier RG (1984) Characterization of the intermittent breathing pattern in *Xenopus laevis*. *J Exp Biol* 110:291-309.

Branco LG, Glass ML, Hoffmann A (1992) Central chemoreceptor drive to breathing in unanesthetized toads, *Bufo paracnemis*. *Respir Physiol* 87:195-204.

Brown DD, Cai L (2007) Amphibian metamorphosis. *Dev Biol* 306:20-33.

Burggren WW, West NH (1982) Changing respiratory importance of gills, lungs and skin during metamorphosis in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *Respir Physiol* 47:151-164.

Burggren W, Doyle M (1986) Ontogeny of regulation of gill and lung ventilation in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Respir Physiol* 66:279-291.

Burggren WW, Infante RL (1994) The respiratory transition from water to air breathing during amphibian metamorphosis. *Amer Zool* 34:238-246.

Burleson ML, Milsom WK (2003) Comparative aspects of O₂ chemoreception: anatomy, physiology, and environmental adaptations. In: Lahiri, S., Semenza, G.L., Prabhakar, N.R. (Eds.), *Oxygen Sensing: Responses and Adaptation to Hypoxia*. Marcel Dekker, New York, pp. 685-707.

Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J (2001) The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 185:135-144.

Crespi EJ, Denver RJ (2005) Ancient origins of human developmental plasticity. *Am J Hum Biol* 17:44-54.

Crowder WC, Nie M, Ultsch GR (1998) Oxygen uptake in bullfrog tadpoles (*Rana catesbeiana*). J Exp Zool 280:121-134.

Cutz E, Jackson A (1999) Neuroepithelial bodies as airway oxygen sensors. Respir Physiol 115:201-214.

Datson NA, Morsink MC, Meijer OC, de Kloet ER (2008) Central corticosteroid actions: Search for gene targets. Eur J Pharmacol 583:272-289.

Denver RJ (1993) Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. Gen Comp Endocrinol 91:38-51.

Denver RJ (1997a) Proximate mechanisms of phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. Am. Zool. 37:172-184.

Denver RJ (1997b) Environmental stress as a developmental cue: corticotropin-releasing hormone is a proximate mediator of adaptive phenotypic plasticity in amphibian metamorphosis. Horm Behav 31:169-179.

Denver RJ (1998) The molecular basis of thyroid hormone-dependent central nervous system remodeling during amphibian metamorphosis. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol 119:219-228.

Denver RJ (1999) Evolution of the corticotropin-releasing hormone signaling system and its role in stress-induced phenotypic plasticity. Ann N Y Acad Sci 897:46-53.

Denver RJ (2009) Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. Gen Comp Endocrinol 164:20-31.

Denver RJ (2013) Neuroendocrinology of amphibian metamorphosis. Curr Top Dev Biol 103:195-227.

Dodd MHI, Dodd JM (1976) The biology of metamorphosis. In B. Lofts (Ed.), Physiology of the amphibia. New York: Academic Press. pp. 467-599

Duchcherer M, Wilson RJA (2008) Respiratory oscillators in lower vertebrates. In: International symposium on respiratory control. St-Maximin, France, P. 13.

Duchcherer M, Baghdadwala MI, Paramonov J, Wilson RJ (2013) Localization of essential rhombomeres for respiratory rhythm generation in bullfrog tadpoles using a binary search algorithm: Rhombomere 7 is essential for the gill rhythm and suppresses lung bursts before metamorphosis. Dev Neurobiol 73:888-898.

Dupont W, Leboulenger F, Vaudry H, Vaillant R (1976) Regulation of the aldosterone secretion in the frog *Rana esculenta* L. Gen Comp Endocrinol 29:51-60.

Erasmus Bde W, Howell BJ, Rahn H (1970) Ontogeny of acid-base balance in the bullfrog and chicken. *Respir Physiol* 11:46-53.

Etkin W (1968). Hormonal control of amphibian metamorphosis. In W. Etkin & L. I. Gilbert (Eds.), *Metamorphosis: A problem in developmental biology*. New York: Appleton-Century-Crofts. pp. 313-348.

Feder ME, Burggren WW (1985) Cutaneous gas exchange in vertebrates: design, patterns, control and implications. *Biol Rev Camb Philos Soc* 60:1-45.

Feldman JL, McCrimmon DR (2003) Neural control of breathing. In: Squire, L.R., Bloom, F.E., McConnell, S.K., Roberts, J.L., Spitzer, N.C., Zigmond, M.J. (Eds.), *Fundamental Neuroscience*. Academic Press, Amsterdam / Boston / London / New York / Oxford / Paris / San Diego / San Francisco / Singapore / Sydney / Tokyo, pp. 967–990.

Feldman JL, Del Negro CA (2006) Looking for inspiration: new perspectives on respiratory rhythm. *Nat Rev Neurosci* 7:232-242.

Fournier S, Allard M, Roussin S, Kinkead R (2007) Developmental changes in central O₂ chemoreflex in *Rana catesbeiana*: the role of noradrenergic modulation. *J Exp Biol* 210:3015-3026.

Fournier S, Dube PL, Kinkead R (2012) Corticosterone promotes emergence of fictive air breathing in *Xenopus laevis* Daudin tadpole brainstems. *J Exp Biol* 215:1144-1150.

Gans C, De Jongh HJ, Farber J (1969) Bullfrog (*Rana catesbeiana*) ventilation: how does the frog breathe? *Science* 163:1223-1225.

Gdovin MJ, Torgerson CS, Remmers JE (1999) The fictively breathing tadpole brainstem preparation as a model for the development of respiratory pattern generation and central chemoreception. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 124:275-286.

Gilmour KM (2001) The CO₂/pH ventilatory drive in fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 130:219-240.

Gilstrap LC, Hightower ES, Clewell W, D'Alton M. (2000) Antenatal corticosteroids revisited: repeat courses. *NIH Consensus Statement* 17:1–10

Glennemeier KA, Denver RJ (2002) Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *J Exp Zool* 292:32-40.

Goater CP (1994) Growth and Survival of postmetamorphic toads—interactions among larval history, density, and parasitism. *Ecology* 75:2264-2274.

Gona AG, Uray NJ, Hauser KF (1988) Neurogenesis of the frog cerebellum. In: Pollack ED, Bibb HD, editors. *Developmental Neurobiology of the Frog*. New York: Wiley-Liss, 255-76.

Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R (1994) Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* 74:829-898.

Goulding M, Pfaff SL (2005) Development of circuits that generate simple rhythmic behaviors in vertebrates. *Curr Opin Neurobiol* 15:14-20.

Gradwell N (1972) Gill irrigation in *Rana catesbeiana*. II. On the musculoskeletal mechanism. *Can J Zool* 50:501-521.

Gray PA, Janczewski WA, Mellen N, McCrimmon DR, Feldman JL (2001) Normal breathing requires preBotzinger complex neurokinin-1 receptor-expressing neurons. *Nat Neurosci* 4:927-930.

Guardiola-Diaz HM, Kolinske JS, Gates LH, Seasholtz AF (1996) Negative glucocorticoid regulation of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-stimulated corticotropin-releasing hormone-reporter expression in AtT-20 cells. *Mol Endocrinol* 10:317-329.

Guyenet PG (2014) Regulation of breathing and autonomic outflows by chemoreceptors. *Compr Physiol* 4:1511-1562.

Hedrick MS (2005) Development of respiratory rhythm generation in ectothermic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 149:29-41.

Holley HS, Behan M, Wenninger JM (2012) Age and sex differences in the ventilatory response to hypoxia and hypercapnia in awake neonatal, pre-pubertal and young adult rats. *Respir Physiol Neurobiol* 180:79-87.

Hsü CY, Liang HM (1970) Sex races of *Rana catesbeiana* in taiwan. *Herpetologica*, Vol. 26, No. 2, pp. 214-221

Hsu CY, Yu NW, Liang HM (1971) Induction of sex reversal in female tadpoles of *Rana catesbeiana* by temperature treatment. *Endocrinol Jpn* 18:243-251.

Hu F, Crespi EJ, Denver RJ (2008) Programming neuroendocrine stress axis activity by exposure to glucocorticoids during postembryonic development of the frog, *Xenopus laevis*. *Endocrinology* 149:5470-5481.

Infantino RL Jr. (1992) Ontogeny of Ventilatory Regulation in the Bullfrog *Rana catesbeiana* (PhD Dissertation). University of Massachusetts, Amherst, MA.

Janczewski WA, Onimaru H, Homma I, Feldman JL (2002) Opioid-resistant respiratory pathway from the preinspiratory neurones to abdominal muscles: in vivo and in vitro study in the newborn rat. *J Physiol* 545:1017-1026.

Jia X, Burggren W (1997) Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). I. Reflex ventilatory responses to ambient hyperoxia, hypoxia and NaCN. *J Exp Biol* 200:2229-2236.

Jia X, Burggren W (1997) Developmental changes in chemoreceptive control of gill ventilation in larval bullfrogs (*Rana catesbeiana*). II. Sites of O₂-sensitive chemoreceptors. *J Exp Biol* 200:2237-2248.

Johnson SM, Mitchell GS (1998) N-methyl-D-aspartate-mediated bulbospinal respiratory drive is pH/P(CO₂)-insensitive in turtle brainstem-spinal cord. *Respir Physiol* 113:201-212.

Jonz MG, Nurse CA (2006) Ontogenesis of oxygen chemoreception in aquatic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 154:139-152.

Just JJ, Gatz RN, Crawford EC, Jr. (1973) Changes in respiratory functions during metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Respir Physiol* 17:276-282.

Kikuyama S, Kawamura K, Tanaka S, Yamamoto K (1993) Aspects of amphibian metamorphosis: hormonal control. *Int Rev Cytol* 145:105-148.

Kinkead R, Milsom WK (1994) Chemoreceptors and control of episodic breathing in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Respir Physiol* 95:81-98.

Kinkead R, Filmeyer WG, Mitchell GS, Milsom WK (1994) Vagal input enhances responsiveness of respiratory discharge to central changes in pH/CO₂ in bullfrogs. *J Appl Physiol* (1985) 77: 2048-2051.

Kinkead R (1997) Episodic breathing in frogs: converging hypotheses on neural control of respiration in air breathing vertebrates. *Am. Zool.* 37:31-40.

Kinkead R, Milsom WK (1997) Role of pulmonary stretch receptor feedback in control of episodic breathing in the bullfrog. *Am J Physiol* 272:R497-508.

Kinkead R (2009) Phylogenetic trends in respiratory rhythmogenesis: insights from ectothermic vertebrates. *Respir Physiol Neurobiol* 168:39-48.

Kogo N, Remmers JE (1994) Neural organization of the ventilatory activity in the frog, *Rana catesbeiana*. II. *J Neurobiol* 25:1080-1094.

Kogo N, Perry SF, Remmers JE (1994) Neural organization of the ventilatory activity in the frog, *Rana catesbeiana*. I. *J Neurobiol* 25:1067-1079.

Kollros JJ (1981) Transitions in the nervous system during amphibian metamorphosis. In: Gilbert LI, Frieden E, editors. *Metamorphosis. A Problem in Developmental Biology*, 2nd Edn. New York: Plenum, pp. 445–59.

Kollros JJ, McMurray VM (1956) The mesencephalic V nucleus in anurans. II. The influence of thyroid hormone on cell size and cell number. *J Exp Zool* 131:1–26.

Krain LP, Denver RJ (2004) Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis*. *J Endocrinol* 181:91-104.

Kulkarni SS, Buchholz DR (2012) Beyond synergy: corticosterone and thyroid hormone have numerous interaction effects on gene regulation in *Xenopus tropicalis* tadpoles. *Endocrinology* 153:5309-5324.

Kusakabe T (2002) Carotid labyrinth of amphibians. *Microsc Res Tech* 59:207-226.

Laudet V (2011) The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr Biol* 21:R726-737.

Liao GS, Kubin L, Galante RJ, Fishman AP, Pack AI (1996) Respiratory activity in the facial nucleus in an in vitro brainstem of tadpole, *Rana catesbeiana*. *J Physiol* 492 (Pt 2):529-544.

Licht P, McCreery BR, Barnes R, Pang R (1983) Seasonal and stress related changes in plasma gonadotropins, sex steroids, and corticosterone in the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen Comp Endocrinol* 50:124-145.

Liu L, Li A, Matthews SG (2001) Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E729-739.

Martin JV, Williams DB, Fitzgerald RM, Im HK, Vonvoigtlander PF (1996) Thyroid hormonal modulation of the binding and activity of the GABAA receptor complex of brain. *Neuroscience* 73:705-713.

Matthews SG (2002) Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab* 13:373-380.

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (1995) Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 84:55-61.

Mikics E, Kruk MR, Haller J (2004) Genomic and non-genomic effects of glucocorticoids on aggressive behavior in male rats. *Psychoneuroendocrinology* 29:618-635.

Milsom WK The phylogeny of central chemoreception. *Respir Physiol Neurobiol* 173:195-200.

Milsom WK, Harris MB, Reid SG (1997) Do descending influences alternate to produce episodic breathing? *Respir Physiol* 110:307-317.

Milsom WK (2008) Evolutionary trends in respiratory mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 605:293-298.

Minnich B, Bartel H, Lametschwandtner A (2002) How a highly complex three-dimensional network of blood vessels regresses: the gill blood vascular system of tadpoles of *Xenopus* during metamorphosis. A SEM study on microvascular corrosion casts. *Microvasc Res* 64:425-437.

Morsink MC, Steenbergen PJ, Vos JB, Karst H, Joels M, De Kloet ER, Datson NA (2006) Acute activation of hippocampal glucocorticoid receptors results in different waves of gene expression throughout time. *J Neuroendocrinol* 18:239-252.

Morsink MC, Joels M, Sarabdjitsingh RA, Meijer OC, De Kloet ER, Datson NA (2006) The dynamic pattern of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional responses in neuronal PC12 cells. *J Neurochem* 99:1282-1298.

Olmstead AW, Lindberg-Livingston A, Degitz SJ Genotyping sex in the amphibian, *Xenopus* (*Silurana*) *tropicalis*, for endocrine disruptor bioassays. *Aquat Toxicol* 98:60-66.

Oppenheimer JH, Schwartz HL, Strait KA (1995) An integrated view of thyroid hormone actions in vivo. In B. D. Weintraub (Ed.), *Molecular endocrinology: Basic concepts and clinical correlations*. New York: Raven Press, Ltd. pp. 249-268.

Regard E, Taurog A, Nakashima T (1978) Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles and in adult anuran amphibia. *Endocrinology* 102:674-684.

Reid SG, Meier JT, Milsom WK (2000) The influence of descending inputs on breathing pattern formation in the isolated bullfrog brainstem-spinal cord. *Respir Physiol* 120:197-211.

Relyea RA, Hoverman JT (2003) The impact of larval predators and competitors on the morphology and fitness of juvenile treefrogs. *Oecologia* 134:596-604.

Reul JM, de Kloet ER (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505-2511.

Richter DW, Spyer KM (2001) Studying rhythmogenesis of breathing: comparison of in vivo and in vitro models. *Trends Neurosci* 24:464-472.

Sandi C, Venero C, Guaza C (1996) Novelty-related rapid locomotor effects of corticosterone in rats. *Eur J Neurosci* 8:794-800.

Scott D (1994) The effect of larval density on adult demographic traits in *Ambystoma opacum*. *Ecology* 75:1383-1396.

Semlitsch R, Scott D, Pechmann J (1988) Time and size at metamorphosis related to adult fitness in *Ambystoma talpoideum*. *Ecology* 69:184-192.

Shelton G, Croghan PC (1988) Gas exchange and its control in non-steady-state systems: the consequences of evolution from water to air breathing in vertebrates. *Can. J. Zool.* 66:109-123.

Smatresk NJ (1990) Chemoreceptor modulation of endogenous respiratory rhythms in vertebrates. *Am J Physiol* 259:R887-897.

Smatresk NJ, Smits AW (1991) Effects of central and peripheral chemoreceptor stimulation on ventilation in the marine toad, *Bufo marinus*. *Respir Physiol* 83:223-238.

Straka H, Baker R, Gilland E (2006) Preservation of segmental hindbrain organization in adult frogs. *J Comp Neurol* 494:228-245.

Straus C, Wilson RJ, Remmers JE (2000) Developmental disinhibition: turning off inhibition turns on breathing in vertebrates. *J Neurobiol* 45:75-83.

Suzue T (1984) Respiratory rhythm generation in the in vitro brain stem-spinal cord preparation of the neonatal rat. *J Physiol* 354:173-183.

Takahashi LK, Baker EW, Kalin NH (1990) Ontogeny of behavioral and hormonal responses to stress in prenatally stressed male rat pups. *Physiol Behav* 47:357-364.

Taylor AC, Kollros JJ (1946) Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat Rec* 94:7-13.

Taylor BE, Harris MB, Leiter JC, Gdovin MJ (2003) Ontogeny of central CO₂ chemoreception: chemosensitivity in the ventral medulla of developing bullfrogs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285:R1461-1472.

Taylor BE, Harris MB, Coates EL, Gdovin MJ, Leiter JC (2003) Central CO₂ chemoreception in developing bullfrogs: anomalous response to acetazolamide. *J Appl Physiol* (1985) 94:1204-1212.

Toews DP, Stiffler DF (1990) Compensation of progressive hypercapnia in the toad (*Bufo marinus*) and the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *J Exp Biol* 148:293-302.

Torgerson C, Gdovin M, Remmers J (1997a) Ontogeny of central chemoreception during fictive gill and lung ventilation in an in vitro brainstem preparation of *Rana catesbeiana*. *J Exp Biol* 200:2063-2072.

Torgerson CS, Gdovin MJ, Kogo N, Remmers JE (1997b) Depth profiles of pH and PO₂ in the in vitro brainstem preparation of the tadpole *Rana catesbeiana*. *Respir Physiol* 108:205-213.

Torgerson CS, Gdovin MJ, Remmers JE (1998) Fictive gill and lung ventilation in the pre- and postmetamorphic tadpole brain stem. *J Neurophysiol* 80:2015-2022.

Torgerson CS, Gdovin MJ, Remmers JE (2001) Sites of respiratory rhythmogenesis during development in the tadpole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R913-920.

Torgerson CS, Gdovin MJ, Brandt R, Remmers JE (2001) Location of central respiratory chemoreceptors in the developing tadpole. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280:R921-928.

Trapp T, Rupprecht R, Castren M, Reul JM, Holsboer F (1994) Heterodimerization between mineralocorticoid and glucocorticoid receptor: a new principle of glucocorticoid action in the CNS. *Neuron* 13:1457-1462.

Van Buskirk J, Saxer G (2001) Delayed costs of an induced defense in tadpoles? Morphology, hopping, and development rate at metamorphosis. *Evolution* 55:821-829.

Vasilakos K, Wilson RJ, Kimura N, Remmers JE (2005) Ancient gill and lung oscillators may generate the respiratory rhythm of frogs and rats. *J Neurobiol* 62:369-385.

Vasilakos K, Kimura N, Wilson RJ, Remmers JE (2006) Lung and buccal ventilation in the frog: uncoupling coupled oscillators. *Physiol Biochem Zool* 79:1010-1018.

Via S, Gomulkiewicz R, De Jong G, Scheiner SM, Schlichting CD, Van Tienderen PH (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends Ecol Evol* 10:212-217.

Weinstock M (2001) Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol* 65:427-451.

Wenninger JM, Pan LG, Klum L, Leekley T, Bastastic J, Hodges MR, Feroah TR, Davis S, Forster HV (2004) Large lesions in the pre-Botzinger complex area eliminate eupneic respiratory rhythm in awake goats. *J Appl Physiol* 97:1629-1636.

Wenninger JM, Olson EB Jr, Cotter CJ, Thomas CF, Behan M (2009) Hypoxic and hypercapnic ventilatory responses in aging male vs. aging female rats. *J Appl Physiol.* 106(5):1522-8.

Werner, E. E. (1986). Amphibian metamorphosis: Growth rate, predation risk, and the optimal size at transformation. *Amer. Nat.* 128, 319–341.

Wilson RJ, Vasilakos K, Harris MB, Straus C, Remmers JE (2002) Evidence that ventilatory rhythmogenesis in the frog involves two distinct neuronal oscillators. *J Physiol* 540:557-570.

Wilson RJ, Vasilakos K, Remmers JE (2006) Phylogeny of vertebrate respiratory rhythm generators: the Oscillator Homology Hypothesis. *Respir Physiol Neurobiol* 154:47-60.

Winmill RE, Hedrick MS (2003) Gap junction blockade with carbenoxolone differentially affects fictive breathing in larval and adult bullfrogs. *Respir Physiol Neurobiol* 138:239-251.

Winmill RE, Chen AK, Hedrick MS (2005) Development of the respiratory response to hypoxia in the isolated brainstem of the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Biol* 208:213-222.

Annexe

Figure 2.2D/2.3A : Tableau d'ANOVA de la fréquence pulmonaire fictive

ANOVA Table for Pulmonaire

Inclusion criteria: Premeta 1h from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Drogue	4	29,762	7,440	2,831	,0332	11,326	,735
Subject(Group)	54	141,900	2,628				
Category for Pulmonaire	2	6,992	3,496	10,845	<,0001	21,689	,994
Category for Pulmonaire * Drogue	8	4,336	,542	1,681	,1111	13,449	,706
Category for Pulmonaire * Subject(Group)	108	34,818	,322				

Figure 2.2E/2.3B : Tableau d'ANOVA de la fréquence branchiale fictive

ANOVA Table for Branchiale

Row exclusion: Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Drogue	4	6046,871	1511,718	3,234	,0192	12,935	,799
Subject(Group)	52	24309,307	467,487				
Category for Branchiale	2	113,425	56,713	1,223	,2986	2,445	,252
Category for Branchiale * Drogue	8	374,101	46,763	1,008	,4345	8,066	,442
Category for Branchiale * Subject(Group)	104	4823,693	46,382				

Figure 2.4A/2.5D : Tableau d'ANOVA de la fréquence pulmonaire fictive

ANOVA Table for Pulmonaire

Inclusion criteria: 24h from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Drogue	5	27,295	5,459	2,845	,0220	14,227	,812
Subject(Group)	65	124,701	1,918				
Category for Pulmonaire	1	78,549	78,549	65,117	<,0001	65,117	1,000
Category for Pulmonaire * Drogue	5	19,397	3,879	3,216	,0118	16,081	,866
Category for Pulmonaire * Subject(Group)	65	78,407	1,206				

Figure 2.4B/2.5E : Tableau d'ANOVA de la fréquence branchiale fictive

ANOVA Table for Branchiale

Inclusion criteria: 24h from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Drogue	5	2966,172	593,234	2,930	,0190	14,652	,826
Subject(Group)	65	13158,983	202,446				
Category for Branchiale	1	851,523	851,523	7,336	,0086	7,336	,770
Category for Branchiale * Drogue	5	761,123	152,225	1,311	,2702	6,557	,428
Category for Branchiale * Subject(Group)	65	7544,701	116,072				

Figure 2.6A : Tableau d'ANOVA de la fréquence pulmonaire fictive des têtards

ANOVA Table for Pre-exposure

Row exclusion: Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	70	86,888	1,241				
Category for Pre-exposure	2	21,524	10,762	21,848	<,0001	43,696	1,000
Category for Pre-exposure * Subject	140	68,962	,493				

Figure 2.6B : Tableau d'ANOVA de la fréquence branchiale fictive des têtards

ANOVA Table for Pre-exposure

Row exclusion: Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	67	21211,395	316,588				
Category for Pre-exposure	2	215,396	107,698	2,631	,0757	5,262	,505
Category for Pre-exposure * Subject	134	5485,093	40,934				

Figure 2.6C : Tableau d'ANOVA de la fréquence pulmonaire fictive des adultes

ANOVA Table for Pre-exposure

Inclusion criteria: Meta from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	17	1588,188	93,423				
Category for Pre-exposure	2	122,503	61,251	5,520	,0084	11,039	,827
Category for Pre-exposure * Subject	34	377,304	11,097				

Figure 2.6D : Tableau d'ANOVA du pourcentage de changement de la valeur de base de la fréquence pulmonaire fictive des têtards

ANOVA Table for Pre-exposure

Inclusion criteria: 24h from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	63	15486190,045	245812,540				
Category for Pre-exposure	2	1867215,604	933607,802	10,556	<,0001	21,111	,993
Category for Pre-exposure * Subject	126	11144272,469	88446,607				

Figure 2.6D : Tableau d'ANOVA du pourcentage de changement de la valeur de base de la fréquence pulmonaire fictive des adultes

ANOVA Table for Pre-exposure

Inclusion criteria: Meta from Résultats statview Rana 24h - 1h.svd

	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Value	P-Value	Lambda	Power
Subject	17	750215,619	44130,331				
Category for Pre-exposure	2	195927,586	97963,793	4,817	,0144	9,634	,766
Category for Pre-exposure * Subject	34	691454,352	20336,893				